



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Digestión anaerobia de azúcares reductores para
obtención de biocombustibles: revisión bibliográfica

Autora

Paula Ariadna Marco Lorente

Director

Jaime Soler Herrero

Facultad de Ciencias

Año 2019

**VISTO BUENO DEL DIRECTOR PARA EL DEPÓSITO Y PRESENTACIÓN DEL
TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

JAIME SOLER HERRERO Profesor Contratado Doctor Investigador del
Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta bajo el título “Digestión anaerobia de azúcares reductores para obtención de biocombustibles: revisión bibliográfica” ha sido realizado en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza, bajo mi dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 26 de noviembre de 2019

A handwritten signature in black ink, reading "Jaime Soler". The signature is fluid and cursive, with a large loop at the end of the last name.

Firmado: Jaime Soler Herrero

ÍNDICE

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.– RESUMEN..... | 1 |
| 2.– ABSTRACT..... | 1 |
| 3.– INTRODUCCIÓN | 1 |
| 4.– NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO..... | 2 |
| 5.– METODOLOGÍA | 2 |
| 6. – MARCO TEÓRICO DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 3 |
| 6.1.– CONCEPTOS GENERALES DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 3 |
| 6.1.1.– CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA | 3 |
| 6.1.2.– BIOGÁS..... | 3 |
| 6.1.3.– AZÚCARES REDUCTORES | 4 |
| 6.2.– ETAPAS Y MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA..... | 4 |
| 6.2.1.– HIDRÓLISIS | 4 |
| 6.2.2.– ACIDOGÉNESIS..... | 5 |
| 6.2.3.– ACETOGÉNESIS..... | 6 |
| 6.2.4.– METANOGÉNESIS | 7 |
| 6.3.– PARÁMETROS AMBIENTALES..... | 7 |
| 6.3.1.– pH..... | 7 |
| 6.3.2.– ALCALINIDAD | 9 |
| 6.3.3.– POTENCIAL REDOX..... | 10 |
| 6.3.4.– NUTRIENTES | 10 |
| 6.3.5.– ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV)..... | 11 |
| 6.3.6.– TÓXICOS E INHIBIDORES | 12 |
| 6.4.– PARÁMETROS OPERACIONALES | 14 |
| 6.4.1.– TEMPERATURA | 14 |
| 6.4.2.– AGITACIÓN | 15 |
| 6.4.3.– TIEMPO DE RETENCIÓN..... | 16 |
| 6.4.4.– VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA..... | 18 |
| 6.4.5.– RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO | 18 |
| 7.– MEJORA DE LA PRODUCTIVIDAD | 19 |
| 7.1 – CODIGESTIÓN ANAEROBIA | 19 |
| 7.2– PRETRATAMIENTO DEL SUSTRATO | 21 |
| 7.3– BIOESTIMULACIÓN..... | 21 |
| 7.3.1– MACRONUTRIENTES | 21 |
| 7.3.2– MICRONUTRIENTES..... | 21 |

| | |
|---------------------------|----|
| 7.4- BIOAUMENTACIÓN | 22 |
| 8.- CONCLUSIÓN | 23 |
| 9.- CONCLUSIONS | 24 |
| 10.- ANEXOS | 26 |
| ANEXO 1 | 26 |
| ANEXO 2 | 27 |
| ANEXO 3 | 28 |
| ANEXO 4 | 29 |
| ANEXO 5 | 30 |
| ANEXO 6 | 31 |
| ANEXO 7 | 32 |
| ANEXO 8 | 33 |
| ANEXO 9 | 34 |
| ANEXO 10 | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA | 40 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 Word Cloud de las palabras clave más citadas en los artículos sobre digestión anaerobia recogidos en Scopus | 2 |
| Figura 2 Word Cloud de las palabras clave más citadas en los artículos sobre la aplicación de la digestión anaerobia para la producción de biogás y/o biometano recogidos en Scopus..... | 2 |
| Figura 3 Representación esquemática de las fases de la digestión anaerobia..... | 26 |
| Figura 4 Esquema de la Fermentación acetona–butanol–etanol o ABE (Fermentación ácido-mixta) | 29 |
| Figura 5 Gráfico de la Evolución de la producción de los AGV y el biogás en función del tiempo de retención hidráulico aplicado durante el proceso de fermentación anaerobia..... | 31 |
| Figura 6 Gráfico del efecto del tiempo de retención de sólidos en el progreso de la estabilidad de la digestión anaerobia | 31 |
| Figura 7 Evolución de la producción de los AGV en función de la velocidad de carga orgánica (VCO) aplicada en un proceso de fermentación anaerobia..... | 32 |
| Figura 8 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave | 34 |
| Figura 9 Gráfico de las áreas temáticas tratadas en el número total de artículos publicados que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave | 34 |
| Figura 10 Gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave..... | 35 |
| Figura 11 Producción y consumo de energía primaria en España en el año 2016..... | 35 |
| Figura 12 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave. | 36 |
| Figura 13 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave y que, además, están relacionados con la producción de biogás o de biometano | 36 |
| Figura 14 Gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave (izquierda) y gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave que, además, tratan sobre la producción de biogás y/o biometano (derecha) | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1 Composición del Biogás | 3 |
| Tabla 2 Rangos de concentración de nutrientes necesarios para el correcto crecimiento de las bacterias anaerobias..... | 11 |
| Tabla 3 Tiempos de retención en la fermentación anaerobia en función de la temperatura | 17 |
| Tabla 4 Resumen de las condiciones y aspectos operacionales más relevantes | 23 |
| Tabla 5 Summary of the most relevant operational conditions and aspects | 25 |
| Tabla 6 Resumen de las ventajas de la digestión anaerobia..... | 27 |
| Tabla 7 Resumen de las desventajas de la digestión anaerobia | 27 |
| Tabla 8 Resumen de los productos metabólicos liberados durante la fermentación de diferentes polisacáridos | 28 |
| Tabla 9 Concentraciones (en mg/l) de compuestos inorgánicos inhibitorios del proceso anaerobio. | 30 |
| Tabla 10 Tablas de relaciones C/N más habituales en función del sustrato. | 33 |
| Tabla 11 Producción de biogás a partir de residuos animales..... | 38 |
| Tabla 12 Producción de biogás a partir de residuos vegetales. | 38 |

1.- RESUMEN

La utilización de la digestión anaerobia para la producción de biogás constituye una alternativa energética interesante con respecto a otras fuentes de energía más contaminantes y no renovables, como es el caso de los combustibles fósiles. Debido a ello, en esta revisión bibliográfica pretendemos proporcionar una visión general del proceso, así como de los aspectos relacionados con el mismo, tratando de determinar las condiciones más adecuadas para la producción de biogás. Para tal fin, tras describir algunos términos generales, hemos procedido a tratar, de forma más o menos detallada, cada una de las fases de la digestión anaerobia, además de los principales microorganismos implicados en cada una de ellas. Una vez hecho esto, tras la búsqueda y estudio comparativo de una gran cantidad de artículos, intentamos determinar los parámetros ambientales y operacionales más relevantes con el objetivo de seleccionar los más favorables y hacer hincapié en aquellos factores que pueden afectar negativamente al rendimiento del proceso, aportando posibles soluciones para mantenerlos dentro de unos límites y evitar problemas. Posteriormente, hemos propuesto cuatro posibles estrategias de mejora de la productividad, insistiendo fundamentalmente en la bioaumentación y, sobre todo, en la codigestión, ya que parece ser una técnica muy prometedora debido a la gran cantidad de ventajas que presenta; si bien, todavía no ha sido muy investigada. Finalmente, hemos realizado una conclusión en la cual, a partir de toda la información recopilada, hemos seleccionado las condiciones más adecuadas para la realización de la digestión anaerobia, así como los compuestos y microorganismos más interesantes para aumentar la productividad. Además, también hacemos referencia a algunas técnicas de mejora que, si bien todavía están poco estudiadas, podrían llegar a tener una importante aplicación en el proceso.

2.- ABSTRACT

The use of anaerobic digestion to produce biogas is an interesting energy alternative with respect to other more polluting and non-renewable sources of energy, such as fossil fuels. Because of this, in this literature review we intended to provide an overview of the process, as well as the aspects related to it, trying to determine the most favourable conditions for biogas production. To this end, after describing some general terms, we have tried to treat, more or less specifically, each phase of anaerobic digestion, in addition to the main microorganisms involved in each of them. Once this was done, after the search and comparative study of a lot of articles, we tried to determine the most relevant environmental and operational parameters in order to select the most favourable ones and emphasize those factors that can negatively affect the process performance, providing possible solutions to keep them within limits and avoid problems. Subsequently, we have proposed four possible productivity improvement strategies, insisting primarily on bioaugmentation and, above all, on co-digestion, since it seems to be a very promising technique due to the large number of advantages it presents; although, it has not yet been very researched. Finally, we have made a conclusion in which, based on all the information collected, we have selected the most suitable conditions for carrying out anaerobic digestion, as well as the most interesting compounds and microorganisms to increase productivity. In addition, we also refer to some improvement techniques that, while still poorly studied, could have an important application in the process.

3.- INTRODUCCIÓN

El enorme crecimiento de la población mundial ha supuesto un aumento excesivo de la demanda de energía y, por tanto, de los recursos utilizados para la obtención de combustibles. Durante mucho tiempo, la gran solución al problema de la creciente demanda energética se basó en los combustibles fósiles, como el petróleo, cuyo consumo sigue creciendo actualmente. Sin embargo, este tipo de combustibles presenta dos problemas fundamentales: no son renovables y son muy contaminantes. En consecuencia, esto ha llevado a la necesidad de buscar otras soluciones que, además, sean sostenibles.

4.- NECESIDAD DE HACER UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA Y OBJETIVO

Figura 1 Word Cloud de las palabras clave más citadas en los artículos sobre digestión anaerobia recogidos en Scopus

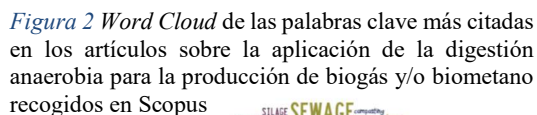


Por otro lado, si nos centramos en las palabras más citadas de los artículos basados en el estudio de la aplicación de la digestión anaerobia para la producción de biogás o de biometano (10.816 artículos), muchas de ellas coinciden con el caso anterior; si bien, en este caso, toman una mayor relevancia términos referentes a sustratos como *manure*, *crops*, *food* (es decir, *food waste*), *algae*, *fruit*, *dairy* (es decir, *dairy waste*), *maize*, etc. e, incluso, *cellulose* y *lignocellulose*.

Por tanto, como podemos ver, existe una inmensa cantidad de artículos referentes a la obtención de biogás mediante digestión anaerobia a partir de una gran diversidad de sustratos. Debido a ello, y como consecuencia de la brevedad de este trabajo, el objetivo principal de este TFG es realizar una revisión bibliográfica en la cual trataremos de identificar y recopilar la información más relevante acerca de la producción de biogás mediante digestión anaerobia a partir de diferentes sustratos (especialmente los r determinar, además, los parámetros, condiciones operacionales, favorables para conseguir el mayor rendimiento.

5.- METODOLOGÍA

Con el fin de lograr el objetivo planteado, procedimos a la realización de búsquedas basadas en el uso de palabras clave referentes a la digestión anaerobia (tanto en inglés como en español) en Alcorze, ScienceDirect, Scopus, Dialnet y Google Scholar. Una vez realizadas las búsquedas, tratamos de seleccionar las fuentes documentales más relevantes, tanto en calidad como en cantidad, incluyendo entre ellas artículos de revistas, libros, tesis doctorales, conferencias, etc. Posteriormente, la información elegida se organizó en una estructura lógica y ordenada, comenzando por los términos más generales y sencillos para, seguidamente, adentrarnos en mayor profundidad en aspectos más específicos (etapas, factores operacionales, microorganismos y técnicas para la mejora de la productividad). Además, en todo momento se trató de expresar dichas ideas de forma clara y concisa con el fin de facilitar la lectura y comprensión.



Fuente: elaboración propia.

6. – MARCO TEÓRICO DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

6.1.– CONCEPTOS GENERALES DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

6.1.1.– CONCEPTO Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

La Digestión Anaerobia es un conjunto de procesos microbiológicos que se producen en ausencia de oxígeno (1) y que ocurren espontáneamente en la naturaleza (en pantanos, yacimientos subterráneos, el estómago de los rumiantes, etc.) (2) provocando la descomposición secuencial de la materia orgánica por acción de diversas poblaciones de microorganismos anaerobios, los cuales conviven sinérgicamente para mantener las condiciones ambientales necesarias para su crecimiento.

Como resultado del proceso realizado por estos microorganismos, se genera el producto final o biogás, que no es más que una mezcla de gases de cuya composición hablaremos posteriormente. Por otro lado, a los restos sólidos o líquidos obtenidos se les denomina “digerido” o “digestato” e, incluso, “lodo”, y se caracterizan por contener los componentes orgánicos menos degradables, que no han podido ser utilizados por los microorganismos; así como nitrógeno, fósforo y otros minerales presentes en la biomasa utilizada como sustrato (1).

Concretamente, la digestión anaerobia se compone de cuatro etapas o procesos metabólicos (explicados en mayor profundidad más adelante): Hidrólisis, Acidogénesis, Acetogénesis y Metanogénesis (ver anexo 1). La realización de dichas etapas es posible gracias a la actuación conjunta de varios grupos fisiológicos de microorganismos, lo cual permitirá la degradación y transformación de sustancias de elevado peso molecular (como polisacáridos, proteínas y grasas) en CO_2 y metano (CH_4), cuya pureza dependerá del sustrato empleado y de los parámetros operacionales y ambientales sucedidos durante el proceso (3–5).

De manera más específica, el metano se genera durante la última fase del proceso o Metanogénesis a partir de precursores como el hidrógeno (H_2) y el dióxido de carbono (CO_2) (metanogénesis hidrogenotrófica) o el ácido acético (metanogénesis acetoclástica), los cuales son el resultado de las actividades de los fermentadores anaerobios (6 y 7).

Finalmente, cabe destacar que este modelo de digestión anaerobia basado en cuatro etapas se conoce como Modelo ADM1 y fue desarrollado por la IWA (Asociación Internacional del Agua) (8) con el fin de proporcionar una base unificada para el modelado de la digestión anaerobia con el objetivo de mejorar y facilitar el diseño, operación y optimización de procesos anaeróbicos en todo el mundo (9).

Por otro lado, en cuanto a las ventajas y desventajas de la digestión anaerobia, existe una extensa y variada bibliografía, siendo mayor la cantidad de ventajas que la de desventajas. Con respecto a las ventajas, consideramos que el resumen efectuado por Edwin Antonio Reyes Aguilera (10), es el más completo (ver anexo 2).

6.1.2.– BIOGÁS

El biogás consiste en una mezcla de gases más ligera que el aire que se genera, normalmente, a través de la digestión anaerobia (mediada por tres grupos tróficos de microorganismos anaerobios) y cuya composición se detalla la Tabla 1 (11).

Este gas resulta de gran interés, pues el metano que contiene puede quemarse para producir calor y electricidad. No obstante, el problema del uso del biogás es que en su composición se encuentra el

Tabla 1 Composición del Biogás

| Gas | | Contenido |
|----------------------|----------------------|---------------|
| Metano | CH_4 | 54,00 - 70,00 |
| Dioxido de carbono | CO_2 | 27,00 - 45,00 |
| Nitrógeno | N_2 | 0,50 - 3,00 |
| Hidrógeno | H_2 | 1,00 - 10,00 |
| Mnóxido de carbono | CO | 0,10 |
| Oxígeno | O_2 | 0,10 |
| Sulfuro de hidrógeno | H_2S | 0,15 |

Fuente: Lugóns, B. Análisis de biodigestores en funcionamiento. [Habana, Cuba]: 2001.

Sulfuro de Hidrógeno, un gas muy corrosivo que puede deteriorar las instalaciones (12). Debido a ello, es necesaria la utilización de diversas tecnologías descritas por diferentes autores (13) con el fin de eliminarlo.

Por otro lado, en muchos casos, para poder utilizar el biogás en la red de gas natural o emplearlo como combustible para vehículos es necesaria su depuración a Biometano; es decir, la eliminación del dióxido de carbono, ya que sin él la combustión es mejor al quedar el metano por encima del 96%, que es el estándar de calidad requerido para su consumo (14).

6.1.3.– AZÚCARES REDUCTORES

Como ya hemos visto previamente, los microorganismos que participan en la digestión anaerobia pueden utilizar diferentes sustratos; si bien, en esta revisión bibliográfica vamos a abordar el estudio de este proceso centrándonos en la utilización de azúcares o carbohidratos como sustrato principal.

Concretamente, los polisacáridos son carbohidratos de alto peso molecular constituidos por un gran número de unidades monoméricas, unidas entre sí mediante un tipo de enlaces covalentes conocidos como enlaces glucosídicos que pueden presentar dos orientaciones diferentes (α o β) que condicionarán la función desempeñada por el polisacárido en los seres vivos. En consecuencia, dada la complejidad de su estructura, el primer paso de la digestión anaerobia es la hidrólisis de estos polisacáridos a azúcares y otros compuestos más sencillos (15).

Entre los azúcares liberados tras la hidrólisis destacan los azúcares reductores; es decir, azúcares que conservan su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, lo cual les permite reaccionar como reductores (dadores de electrones) con otras moléculas que actuarán como oxidantes (aceptando electrones).

Los sustratos con mayor potencial de producir azúcares reductores pueden ser la caña de azúcar, la paja, los cereales, los tubérculos comestibles, residuos forestales, productos del procesamiento del café y de la fabricación de cerveza, etc. Sobre algunos de estos trataremos más adelante.

6.2.– ETAPAS Y MICROBIOLOGÍA DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA

6.2.1.– HIDRÓLISIS

Es el primero de los procesos que tienen lugar durante la digestión anaerobia y se basa en la descomposición de carbohidratos, lípidos y proteínas por acción de unas enzimas extracelulares o **hidrolasas**. Dichas hidrolasas pueden proceder de bacterias anaerobias estrictas o facultativas, protozoos u hongos (16) y son capaces de solubilizar la materia orgánica al romper enlaces específicos con ayuda de moléculas de agua (17), lo cual permitirá la liberación de monómeros y dímeros (aminoácidos, azúcares, etanol y ácidos grasos de cadena larga) (18) capaces de atravesar la membrana celular (19). De este modo, se posibilita su utilización por el grupo de microorganismos responsables de realizar la siguiente etapa de la digestión anaerobia.

Centrándonos en el caso particular de la hidrólisis de polisacáridos como sustrato principal, diferenciamos tres tipos de hidrolasas implicadas: **endocelulasas** (responsables de romper los enlaces internos β -1,4-glucosídicos del polímero); **exocelulasas** (responsables de romper los enlaces β -1,4-glucosídicos de los polímeros reducidos por las endocelulasas dando lugar a la liberación de tetrámeros o dímeros) y **β -glucosidasas** (catalizan la hidrólisis de las moléculas generadas en la última hidrólisis, liberando dos moléculas de glucosa) (17 y 20).

Por otro lado, en lo referente al mecanismo del proceso, la hidrólisis es una etapa lenta que se suele convertir en el paso limitante de la digestión anaerobia (5, 21 y 22). Además, la cinética depende fundamentalmente de la temperatura, del tiempo de retención hidráulico, de la composición del sustrato

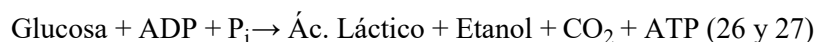
(porcentaje de lignina, carbohidratos, proteínas y grasas), del tamaño de partícula, del pH, de la concentración de NH_4^+ y de la concentración de los productos finales de la hidrólisis (23).

Asimismo, cabe destacar la importancia del sustrato utilizado, pues este no solo condiciona la velocidad de la hidrólisis; sino también la cantidad y tipo de bacterias hidrolíticas presentes. No obstante, de manera general, este proceso es realizado principalmente por las enzimas extracelulares de un grupo de bacterias anaerobias facultativas (grupo I o Bacterias Hidrolíticas-Acidogénicas) cuyos géneros más frecuentes son los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, además de los géneros *Bacillus*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*, *Micrococcus* y *Clostridium* (15).

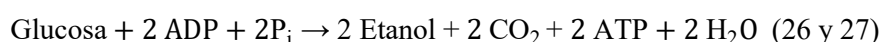
6.2.2.– ACIDOGÉNESIS

Una vez finalizada la hidrólisis, los monómeros liberados son absorbidos por diferentes bacterias anaerobias (facultativas u obligadas) fermentativas o acidogénicas (24) (las cuales pertenecen al grupo I de microorganismos implicados en la digestión anaerobia, lo cual ya hemos comentado anteriormente) con el fin de someterlos a diferentes rutas fermentativas (25) en función del tipo de bacteria, dando como resultado la generación de ácidos orgánicos de cadena corta como ácido butírico, ácido propiónico, y ácido acético; así como hidrógeno y dióxido de carbono (24) (ver Anexo 3). De manera general, durante la digestión anaerobia suelen darse los siguientes tipos de fermentación:

- **Fermentación Heteroláctica** (Fermentación láctica): es un tipo de fermentación láctica realizada por algunos géneros bacterianos como, por ejemplo, *Bifidobacterium*. En este proceso, la fermentación de la glucosa no da lugar a dos moléculas de ácido láctico, sino a una molécula de ácido láctico y a una molécula de acetaldehído, que se transformará posteriormente en etanol. No obstante, en función del género bacteriano implicado, en vez de acetaldehído y etanol, se pueden obtener otros compuestos como ácido acético o ácido fórmico. La reacción es la siguiente:

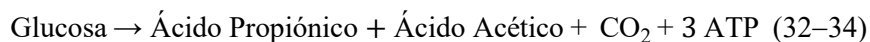


- **Fermentación alcohólica**: consiste en la transformación de azúcares o hidratos de carbono (generalmente de azúcares tipo hexosa como, por ejemplo, la glucosa, la fructosa, la sacarosa) en ausencia de oxígeno (O_2) en dos moléculas de etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), dos moléculas de dióxido de carbono (CO_2) y dos moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico. La reacción puede ser:



- **Fermentación acetona–butanol–etanol o ABE** (Fermentación ácido-mixta): es una variación de la fermentación ácido-mixta en la cual, además de los productos principales resultantes de la fermentación ácido-mixta (28) (ácido láctico, acetato, succinato, formiato) (29), también se generan butanol, etanol, acetona e isopropanol a partir de hidratos de carbono. La fermentación ABE es característica de algunas especies del género *Clostridium* (28) y consta de dos fases:
 - Acidogénesis: es la primera fase del proceso. En ella se produce la formación de acetato, butirato y ATP durante el crecimiento exponencial de las células del cultivo.
 - Solventogénesis: una vez que el cultivo ha alcanzado el estado estacionario, comienza la Solventogénesis, durante la cual se produce la asimilación de los ácidos y la generación de acetona–butanol–etanol como metabolitos secundarios (25) (ver Anexo 4).
- **Fermentación butírica**: consiste en la conversión de glúcidos en ácido butírico en ausencia de oxígeno por acción de algunas bacterias, generalmente bacterias del género *Clostridium* (30 y 31).
- **Fermentación propiónica**: consiste en la transformación de la glucosa (u otra hexosa) en ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico y dióxido de carbono. Este tipo de fermentación es característico de algunos géneros bacterianos como *Propionibacterium*, *Veillonella* y *Clostridium*

(concretamente, *Clostridium propionicum*), los cuales son capaces de producir ácido propiónico a partir de ácido láctico; o bien, a partir de polialcoholes, aminoácidos y otros ácidos orgánicos.



Finalmente, en cuanto a la cinética de la Acidogénesis, es relativamente rápida y el pH óptimo bajo.

6.2.3.– ACETOGENESIS

De los productos resultantes de la Acidogénesis, el H₂, CO₂ y el acetato pueden ser metabolizados directamente por los microorganismos metanogénicos responsables de la siguiente etapa. Sin embargo, otros metabolitos como el etanol, los ácidos grasos volátiles o AGV (35) (ácido propiónico, ácido N-butírico, ácido N-valérico, ácido caprónico, etc.) (36) y algunos compuestos aromáticos deberán ser degradados (oxidados) mediante procesos fermentativos a compuestos más simples como el ácido acético y el H₂ para poder ser empleados (35). De este proceso se encargan las bacterias acetogénicas, que pueden ser de dos tipos:

- **Bacterias acetogénicas productoras de hidrógeno obligadas u OHPA** (*Obligate Hydrogen Producing Acetogens*): dentro de este grupo de bacterias destacan *Syntrophomonas*, *Syntrophobacter*, *Syntrophospora* y *Syntrophus* (37), que son responsables de la producción de H₂ y acetato a partir de compuestos aromáticos, etanol y ácidos grasos (como propionato y butirato) mediante un proceso energéticamente desfavorable (15).

Aunque la mayoría de este tipo de reacciones supone el gasto de energía, el acoplamiento de la función de las bacterias OHPA con bacterias consumidoras de H₂ (como las bacterias metanogénicas hidrogenofílicas y/o las bacterias homoacetogénicas) permite un balance energético favorable como resultado de lo que se conoce como “transferencia interespecífica de hidrógeno”. Esto posibilitará el máximo aprovechamiento de la energía disponible en el reactor anaerobio, lo cual permite el transcurso de reacciones en sistemas con altos potenciales redox (E_h), como los que tienen lugar en la producción de H₂ a partir de NADPH o en la acetogénesis del propionato o butirato, ya que solo están favorecidas a bajas presiones parciales de H₂ (15).

- **Bacterias homoacetogénicas:** dentro de este grupo de bacterias encontramos bacterias estrictamente anaerobias, siendo los géneros más representativos: *Clostridium*, *Acetoanaerobium*, *Acetobacterium*, *Acetogenium*, *Butyribacterium*, *Paleobacter*, *Treponema* y *Halophaga* (37). Dichas bacterias son las responsables de la homoacetogénesis, que consiste en la conversión de hexosas (como la glucosa) exclusivamente en acetato (38). Concretamente, en este proceso se generan un total de cuatro moléculas de acetato a partir de:
 - Ruta Glucolítica: dos moléculas de acetato proceden de las dos moléculas de piruvato generadas en la vía glucolítica y una procede de la reducción del CO₂ producido en la reacción.
 - Ruta Wood-Ljungdahl o Vía del Acetil-CoA: la mayoría de los homoacetógenos convierte el CO₂ en acetato por esta vía, dando lugar a una molécula de acetato.

Los electrones necesarios para la reducción del CO₂ proceden del H₂ y de una gran variedad de compuestos (como azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, aminoácidos y ciertas bases nitrogenadas) (15). Por tanto, al contrario de lo que ocurría con las bacterias OHPA, estas bacterias no producen H₂, sino que lo consumen. Esto es muy importante, ya que el resultado neto de su metabolismo permite el mantenimiento de bajas presiones parciales de H₂, siendo esto fundamental para que las bacterias acidogénicas y las bacterias OHPA puedan realizar su función (35), puesto que, para que se produzca la acetogénesis, el hidrógeno generado debe ser utilizado y consumido a la misma velocidad a la que se va produciendo (39).

6.2.4.– METANOGENESIS

La metanogénesis es la etapa final de la digestión anaerobia y consiste en la transformación de los productos intermedios (40) (sustratos de uno o dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente) (35), derivados de las etapas anteriores, en metano por acción de los microorganismos metanogénicos, los cuales se caracterizan por estar clasificados dentro del dominio *Archaea* (29). Concretamente, las *archaeas* metanogénicas son anaerobias estrictas, presentan una monocapa lipídica muy resistente (de hecho, está ampliamente distribuida en bacterias hipertermófilas) y son responsables de las dos rutas principales de la metanogénesis, que son:

- **Metanogénesis Acetoclástica:** tras un proceso de descarboxilación (41), se produce la reducción del grupo metilo del acetato a metano y la oxidación de su grupo carboxilo a CO_2 , dando lugar a la liberación de metano, CO_2 y energía (aunque bastante pobre (42)) sin afectar a la concentración de H_2 en el gas. De hecho, esto es muy importante, pues permite controlar el pH del medio como consecuencia de la eliminación del acetato y la producción de CO_2 , que, junto con el agua, da lugar a bicarbonato, que actúa como un sistema tampón del pH del medio.

En cuanto a los microorganismos responsables de esta ruta, esta es realizada específicamente por los géneros *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (antes conocido como *Methanotrix*), que son los únicos capaces de utilizar el acetato como aceptor de electrones para la síntesis del metano (41):

- Género *Methanosarcina* (destaca *Methanosarcina barkeri*): presenta una baja afinidad por el acetato como sustrato y puede utilizar otros compuestos como metilaminas y metanol. Por otro lado, $\text{pH} < 7$ y una elevada concentración de acetato favorecen su crecimiento. Además, están mejor adaptadas al etanol que las *archaeas* del género *Methanosaeta*.
 - Género *Methanosaeta* o *Methanotrix* (destaca *Methanosaeta thermophila*): presenta una gran afinidad por el acetato (por lo que es recomendable mantener un alto contenido de este grupo de *archaeas* en el digestor anaerobio) pero no puede utilizar H_2 , metanol ni metilaminas; si bien no se ven inhibidas por el H_2 ni por el ácido fórmico. Por otro lado, $\text{pH} = 7$ y una baja concentración de acetato (frecuente en reactores) favorecen su crecimiento (42 y 43).
- **Metanogénesis Hidrogenotrófica:** consiste en la formación de metano a partir de CO_2 y H_2 por acción de *archaeas* metanogénicas utilizadoras de hidrógeno, las cuales, según la clasificación realizada por Stafford (44), se componen de seis géneros principales que son *Methanobacterium*, *Methanosarcina*, *Methanococcus*, *Methanobacillus*, *Methanosaeta* (o *Methanotrix*) y *Methanospirillum*. Dichos microorganismos resultan muy importantes, pues al utilizar el H_2 como aceptor de electrones para la generación de metano, permiten controlar el potencial redox de la fermentación del digestor realizada por las bacterias acetogénicas OHPA. De este modo, se evita la pérdida de H_2 y CO_2 durante el crecimiento microbiano a partir del uso de compuestos multicarbonados como sustrato, dando lugar a una mayor eficiencia termodinámica (45).

Finalmente, aunque, como podemos ver, la mayoría de los organismos metanogénicos es capaz de utilizar el H_2 como aceptor de electrones y solo dos géneros utilizan acetato, el 70% del metano producido en los reactores anaerobios se forma a partir de acetato (41), mientras que el 30% restante procede del CO_2 y H_2 (10).

6.3.– PARÁMETROS AMBIENTALES

6.3.1.– pH

Se puede considerar el pH como uno de los parámetros más importantes durante la digestión anaerobia (18), pues pequeños cambios en el pH afectan considerablemente (45) al metabolismo microbiano que se produce en el interior del digestor donde va a tener lugar el proceso (18). Concretamente, los

microorganismos anaerobios responsables de este proceso necesitan de forma estricta que el pH se encuentre en torno a la neutralidad, aunque puede haber cierta oscilación (46). De este modo, en función del pH del medio, se favorecerá el crecimiento y actividad de un tipo de microorganismos u otro:

- **Hidrolíticos:** rango de pH 7,2–7,4 (47 y 48).
- **Acidogénicos:** rango de pH 5,5–6,5 (35).
- **Acetogénicos:** rango de pH 7–7,2.
- **Metanogénicos:** rango de pH 6,5–7,5 (47 y 48). Estos microorganismos son más sensibles a las variaciones del pH que el resto de los microorganismos, lo cual es importante tener en cuenta (35).

En consecuencia, en función del pH del medio, se producirá un cambio en la actividad enzimática de los microorganismos que afectará, no solo a la cantidad de biogás producido, sino también a su composición (47 y 48). Por tanto, podemos diferenciar dos situaciones:

- **Situación favorable:** para que la digestión anaerobia pueda llevarse a cabo correctamente, es necesario que el pH esté comprendido siempre entre 6,0 y 8,3 (46), ya que valores por encima o por debajo son desfavorables. Además, casi todos los autores afirman que es conveniente mantener los valores del pH cercanos a la neutralidad; si bien, otros indican que no se puede generalizar dadas las diferentes características del sustrato y de los grupos microbianos intervinientes (49).

Por otro lado, también se ha visto que una disminución del pH de 7,5 a 7,0 durante la digestión termófila genera un gran incremento en la producción de metano de hasta cuatro veces (50).

- **Situación desfavorable:** podemos diferenciar entre
 - pH < 6,0: debido a su gran sensibilidad al pH, se produce la disminución de la actividad de los microorganismos metanogénicos, lo cual deriva en la acumulación de Acetato, CO₂ e H₂ (precursores del CH₄). En consecuencia, se genera un biogás muy pobre en metano (poco interesante debido a sus bajas cualidades energéticas) y un aumento de la presión parcial de H₂, lo cual inhibe la acción de las bacterias acetogénicas; concretamente, de las OHPA, ya que requieren de la “transferencia interespecífica de hidrógeno” con las *archaeas* metanogénicas para realizar su función y degradar los ácidos grasos volátiles (especialmente el butirato y propionato) (51 y 35). Como resultado, se produce la acumulación de estos ácidos grasos volátiles que provocarán una disminución del Bicarbonato y, por tanto, del pH, desencadenando en un fallo del proceso si no se corrige el problema (35).

Algunas posibles soluciones son:

- Reducir la tasa de carga orgánica volumétrica hasta retornar a los rangos de operación normales y luego incrementarla de nuevo gradualmente a medida que el proceso se recupera. De este modo, los ácidos grasos volátiles se consumen más rápido de lo que se generan.
- Reducir la tasa de carga orgánica + adición de compuestos para ajustar el pH (35) (fertilizante, cenizas, agua amoniacal diluida, (10) bicarbonato de sodio o potasio, carbonato de calcio, nitrato de sodio, hidróxido de calcio o de sodio, etc. (52))
- Dosificación periódica de O₂: elimina drásticamente el exceso de ácidos grasos volátiles producidos por microorganismos facultativos (35).
- pH > 8,3: cuando el pH aumenta, se produce un incremento de la concentración de NH₄⁺, lo cual genera toxicidad (53 y 54) debido a su cambio hacia formas más tóxicas y no iónicas de NH₃ (35). En este caso, para solucionar el problema, podemos sacar frecuentemente una pequeña cantidad de efluente y agregar materia orgánica fresca en la misma cantidad.

En resumen, para mantener el valor de pH constante es esencial controlar la relación entre la concentración de AGV y la concentración de bicarbonato, los cuales podrían ser añadidos en el reactor continuo durante el periodo de inicio (55).

6.3.2.– ALCALINIDAD

El pH en un sistema anaeróbico operando entre los rangos de consenso es principalmente controlado por la alcalinidad natural del propio sistema, por lo que el monitoreo de la alcalinidad durante la digestión anaerobia es un factor muy importante, ya que determina si un sistema puede prevenir rápidos cambios en el pH gracias al efecto tampón de distintas especies químicas. Concretamente, la alcalinidad depende principalmente de (56):

- **Concentración de Bicarbonato** ($pK_a = 6,35$): en el rango óptimo de pH en un digestor anaerobio (es decir, en torno a la neutralidad) la mejor especie con efecto tampón es el bicarbonato (57).
- **Concentración de Amonio** ($pK_a = 9,4$): la destrucción de materia orgánica (principalmente proteínas) libera amoníaco (NH_3), el cual reacciona con el CO_2 para producir bicarbonato de amonio, que contribuye positivamente a la alcalinidad del sistema. No obstante, esto es aplicable solo a algunos casos, pues en el caso de los sustratos ricos en carbohidratos (sobre los cuales nos estamos centrando en este TFG) no se produce esta contribución a la alcalinidad al carecer de nitrógeno orgánico, por lo que será necesaria una suplementación de alcalinidad utilizando químicos (35) o adicionando cosustratos (como veremos más adelante).
- **Concentración de Ácidos Grasos Volátiles** ($pK_a = 4,75$): contribuyen negativamente a la alcalinidad; si bien, dicha contribución negativa ocurre a valores de pH entre 3,75 y 5,75, por lo que resulta poco importante, ya que nunca se van a alcanzar valores tan bajos durante la digestión anaerobia. De hecho, esto solo ocurre cuando, por algún problema, toda la alcalinidad del medio no es suficiente para la neutralización de los ácidos volátiles (provocando la caída del pH), lo cual sería una situación bastante grave, ya que, al manifestarse de manera tardía, la corrección de las fallas que se han producido es complicada. Debido a ello, es importante evaluar simultáneamente los parámetros de pH, ácidos grasos volátiles, alcalinidad bicarbonática y total (58).

En principio, la alcalinidad está directamente asociada al sustrato; si bien, puede verse incrementada o disminuida durante la digestión anaerobia como consecuencia de la formación de los compuestos nombrados anteriormente a lo largo del proceso (59) o por la adición exógena de otros compuestos químicos con el fin de suplementar la alcalinidad (se pueden utilizar bicarbonato de sodio, cal, hidróxido de sodio y potasio, hidróxido de amonio, carbonato de sodio y gas amoníaco; si bien, normalmente, se suele utilizar bicarbonato debido a su alta solubilidad y baja toxicidad (35), mientras que, por otro lado, se suele evitar algunas sales, como las de potasio y amonio, ya que causan efectos tóxicos (60)).

Un valor adecuado de alcalinidad estaría comprendido entre 2000 y 3000 mg de $CaCO_3/L$ (46) (si bien puede variar entre 1500 y 5000 mg $CaCO_3/L$) (61) ya que una alcalinidad elevada supone una mayor estabilidad y, por tanto, una resistencia más eficaz a los cambios repentinos del pH. No obstante, concentraciones por encima de 6.500 mg/l con pH superior a 7,4 sería un indicativo de que la alcalinidad está ejerciendo efectos tóxicos sobre la actividad bacteriana (60).

Como hemos podido ver, la monitorización de la alcalinidad es fundamental para asegurar el correcto funcionamiento del proceso. De hecho, el uso de la alcalinidad como parámetro de control durante los procesos anaerobios en lugar del pH es más eficiente, ya que la alcalinidad se expresa en escala lineal, mientras que el pH se expresa en escala logarítmica. Por lo tanto, una pequeña disminución de pH implica un gran consumo de alcalinidad y, como resultado, la pérdida de la capacidad amortiguadora (62).

Por otro lado, también es importante aclarar que para monitorizar la alcalinidad no se mide la alcalinidad total o AT (alcalinidad a pH 4,3), sino la alcalinidad parcial o AP (alcalinidad a pH 5,7). Esto se debe a que la alcalinidad total refleja los niveles de ácidos grasos volátiles ($pK_a = 4,75$) y bicarbonato ($pK_a = 6,35$). Debido a ello, un aumento de ácidos grasos volátiles derivado de un incremento de la inestabilidad del sistema provocará una disminución proporcional del bicarbonato y, en consecuencia, el valor de la alcalinidad total permanecerá constante, por lo que no es un buen indicativo de esta situación.

Por el contrario, la alcalinidad parcial o AP, al medirse a pH 5,75 depende mayoritariamente de la concentración de bicarbonato, cuya concentración disminuirá en situación de inestabilidad. Debido a ello, la alcalinidad parcial o AP se considera un parámetro de seguimiento útil (56 y 63) en oposición al valor total, que se considera un valor poco sensible a la estabilidad del proceso.

6.3.3.– POTENCIAL REDOX

Para que las poblaciones de microorganismos metanogénicos puedan desarrollarse correctamente y realizar su función y, por tanto, que la digestión anaerobia se produzca con una alta eficiencia, es necesario mantener bajo el valor del potencial redox (ORP), concretamente entre -220 mV y -350 mV, dando lugar a un entorno fuertemente reductor (35 y 64). Esto se consigue gracias a la adición de agentes reductores fuertes (como titanio III, cisteína o sulfuro) (35) e impidiendo o evitando la entrada de oxidantes como sulfatos, nitratos o nitritos y oxígeno (procedente del aire) (64 y 65).

En relación con lo dicho en el párrafo anterior, el potencial redox se utiliza como un indicador temprano de la inestabilidad del sistema, ya que varía más rápido que la ratio de alcalinidad ante una inestabilidad inminente en el proceso. Por otro lado, también podría servir como indicador de cambios que no implican una inestabilidad inminente, como por ejemplo un cambio en la composición de la materia prima o en el pH (66).

Sin embargo, pese a la posible utilidad del potencial redox como indicador, para su medición es necesaria la utilización de electrodos sumergidos que indican el voltaje entre las sustancias oxidantes y las sustancias reductoras que se encuentran disueltas en el digestato (66 y 67). Debido a ello, el potencial redox es poco medido en reactores industriales ya que los electrodos requieren de un mantenimiento frecuente y una instalación más sofisticada (66).

6.3.4.– NUTRIENTES

Con el fin de que la flora bacteriana pueda desarrollarse correctamente y realizar su función, es necesario que el medio a digerir por digestión anaerobia presente una cierta cantidad de nutrientes, los cuales pueden clasificarse en dos grupos en función de la cantidad requerida: macronutrientes (N, P, S) y micronutrientes (oligoelementos, como el Fe, Ni, Co, etc.) (68). No obstante, debido al lento crecimiento de los microorganismos anaerobios y a los bajos índices de producción de biomasa, los requerimientos nutricionales que presentan son bajos, siendo esta una diferencia importante con respecto a los procesos aerobios.

Concretamente, para producir la biomasa, los microorganismos anaerobios exigen el suministro de una serie de nutrientes minerales (N, S, P, Ca, Mg y oligoelementos como Fe, Co, Mo, Se, Ca, Mg, Zn, Cu, Mn, W y B) (35), así como de una fuente de carbono y de energía. Por otro lado, para determinados procesos necesitan, además, compuestos orgánicos especiales, como vitaminas. De manera resumida, los nutrientes principales de un sistema anaerobio son N, S, P, Fe, Co, Ni, Mo, Se, riboflavina y vitamina B₁₂ (69 y 70).

Los residuos agrícolas y municipales suelen contener cantidades adecuadas de los elementos enunciados anteriormente (71). Por otro lado, en el caso de los residuos ganaderos, estos también presentan una

concentración suficiente de todos los nutrientes, siendo más común los problemas por exceso que por defecto (72).

Macronutrientes

- **Fósforo:** se requiere unos 10 a 25 g por kg de biomasa (72). En cuanto a la relación C/P, el valor óptimo es C/P = 150/1 (valores inferiores no generan inhibición) (73).

Tabla 2 Rangos de concentración de nutrientes necesarios para el correcto crecimiento de las bacterias anaerobias

| | g/kg SSV | g/kg DQO (B) |
|------------------|----------|--------------|
| Nitrógeno | 80-120 | 55-85 |
| Fósforo | 10-25 | 7-18 |
| Azufre | 10-25 | 7-18 |
| Hierro | 5-15 | 4-11 |

Fuente: adaptación de Henze M, Harremoes P, Jansen JC, Arvin E. Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes. Springer; 2010. 432 p.

- **Nitrógeno:** se requiere unos 80 a 120 g por kg de biomasa (72) y una relación C/N entre 15/1 y 45/1, con un valor recomendable de 30/1 (73). El control de la relación C/N es importante, pues valores muy inferiores disminuyen la velocidad de reacción; mientras que, valores muy superiores, crean problemas de inhibición. Esto se debe a que, durante el proceso anaerobio, el nitrógeno orgánico es hidrolizado generando formas amoniacales y, pese a que el nitrógeno amoniacal es un nutriente importante para el crecimiento bacteriano (74), una concentración excesiva causa toxicidad y limita el crecimiento de la población metanogénica (15).

Hay diversidad de opiniones sobre cuál es la relación óptima entre los macronutrientes y la materia orgánica a degradar y esto depende del tipo de sustancias que componen el sustrato. No obstante, en base a la Demanda Química de Oxígeno (DQO) se plantea que un buen balance C:N:P debe ser cercano a 100:1.75:0.25 (75) y una buena C:N:P:S debería ser próxima a 600:15:5:1 (76).

Micronutrientes

- **Níquel:** es particularmente importante para las *archaeas* metanogénicas debido a que se trata de un constituyente estructural de la coenzima F₄₃₀, que participa en la metanogénesis.
- **Cobalto:** es importante debido a que es un componente estructural de la vitamina B₁₂, la cual también participa en la metanogénesis (35).
- **Hierro:** se requieren unos 5 a 10 g por kg de biomasa (72), ya que se ha demostrado que, debido al importante papel que juega en la conversión de acetato en metano, la adición de cantidades adecuadas de hierro permite la aplicación de mayores cargas orgánicas, una vez se ha estimulado la actividad de los microorganismos presentes en el proceso (68 y 77).

Dada la gran relevancia de estos compuestos en la metanogénesis bajo condiciones mesofílicas (35), se ha visto que, tanto el níquel como el cobalto, en unión al hierro, están en concentraciones más elevadas en bacterias metanogénicas que en otros organismos (78). Además, también se ha visto que la adición directa de una mezcla que contenga 1.0 mg FeCl₃, 0,1 mg CoCl₂ y 0,1 mg NiCl₂ por cada litro de reactor mejora el funcionamiento de los sistemas anaerobios consiguiendo, además, una disminución de las altas concentraciones de Ácidos Grasos Volátiles (AGV) en los efluentes. (68 y 77)

6.3.5.– ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES (AGV)

Los ácidos grasos volátiles son un subgrupo de ácidos grasos de bajo peso molecular formados por una cadena corta, compuesta por dos a seis carbonos, que es la responsable del carácter volátil de estos ácidos grasos. Dentro de este tipo de ácidos grasos se incluyen principalmente el ácido acético, propiónico y butírico, así como el ácido isobutírico, valérico, isovalérico y caproico.

En principio, la relevancia de los ácidos grasos volátiles en la digestión anaerobia radica en que es uno de los productos intermediarios mayoritarios del proceso (35), lo cual los convierte en uno de los parámetros más útiles para controlar el estado metabólico del mismo (61), pues nos informa sobre variaciones en el sistema debidas a:

- Una sobrecarga de materia orgánica (79).

- Una alteración del balance entre las bacterias acetogénicas y los microorganismos metanogénicos (que son los dos grupos microbianos principales en la biometanización (57)) derivada de la inhibición de los microorganismos metanogénicos en respuesta a la introducción de tóxicos, cambios en condiciones ambientales o limitación de nutrientes.

Esto se debe a que, en cualquiera de las dos circunstancias, se va a producir una acumulación de acetato y un aumento de la presión parcial de H_2 , provocando la inhibición de las bacterias acetogénicas responsables de la degradación de los ácidos grasos volátiles y, como resultado, la acumulación de estos últimos (35) (lo cual suele disminuir la producción de Biogás (80)). Por tanto, un aumento de la concentración de ácidos grasos libres será un indicativo de desestabilización del proceso.

En principio, según Montes Carmona (81), se pueden considerar como valores óptimos de AGV concentraciones equivalentes a 50 y 500 mg acético/L. Por otro lado, en cuanto al límite de concentración de ácidos grasos volátiles a partir del cual se altera la estabilidad del proceso, éste difiere en función de la bibliografía consultada. Algunos autores estiman que concentraciones de ácidos grasos volátiles inferiores a 50mM (equivalentes a 3000 mg acético/L) no alteran la producción de metano (44 y 79). No obstante, otros autores indican que esta concentración puede variar entre 200 y 2.000 mg acético/L, siendo este el valor extremo a partir del cual se produciría la inhibición de las *archaeas* metanogénicas, aunque no la de las bacterias acidogénicas, como indican diversos autores (61).

Ahora bien, en función del tipo de residuo a digerir, el valor máximo a partir del cual se produciría la inhibición puede variar. De este modo, mientras que algunos autores señalan que una concentración superior a 4000 mg acético/L afectaría negativamente a la producción de metano (44), otros señalan que se han encontrado concentraciones superiores a 5000 mg acético/L en digestores alimentados con estiércol de gallina sin que esto suponga un problema (61).

Cabe señalar, por último, que las formas no ionizadas de ácidos grasos volátiles inhiben a las *archaeas* metanogénicas a bajas concentraciones (entre 30-60 mg acético/L) (35).

Por otro lado, en cuanto a qué ácido graso volátil resulta un mejor indicador, es complicado de determinar, pues cada uno presenta una evolución diferente en función del sustrato utilizado y las condiciones de operación. No obstante, según la bibliografía, los más utilizados serían:

- **Ácido propiónico:** la acumulación de ácido propiónico (69), sobre todo cuando no está ionizado, puede inhibir la acetogénesis (82) y la metanogénesis acetoclástica (83). Se suele utilizar como un indicador de la vuelta a la normalidad del sistema tras una sobrecarga orgánica.
- **Ácidos grasos volátiles de 4C** (Isobutirato y Butirato): se suele utilizar como un indicador temprano de inestabilidad (79).
- **Ácido acético:** la acumulación de acético procedente del ácido butírico (84) y del ácido propiónico (69) puede inhibir la acetogénesis.

No obstante, por el momento, lo más adecuado sería establecer unos límites de forma individualizada para cada tipo de ácido graso volátil (85).

6.3.6.– TÓXICOS E INHIBIDORES

Las sustancias tóxicas o inhibidoras son compuestos presentes en el propio sustrato (antes de su introducción) o que se forman a lo largo del proceso y cuya presencia o acción causa (86) la perturbación de un proceso metabólico o de la viabilidad de los organismos en cuestión, provocando una disminución de la producción del metano durante la digestión anaerobia (15). Concretamente, el efecto de estos compuestos tóxicos se refleja en la respuesta del reactor, las concentraciones de DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno) en el efluente (que pueden llegar a duplicarse) y en el porcentaje de metano en el biogás producido (que puede reducirse hasta la mitad).

En principio, estos efectos tóxicos o inhibidores dependerán de la naturaleza y concentración de la sustancia inhibitoria (87). De hecho, solamente la fracción soluble de dichas sustancias provoca efectos tóxicos. Por otro lado, si el aumento de las sustancias tóxicas se produce de manera lenta y controlada, el sistema es capaz de adaptarse a concentraciones muy elevadas de éstas (88), lo cual ha llevado a la ausencia de un consenso sobre los valores umbral por encima de los cuales las sustancias con potencial tóxico producen su efecto (57).

En cuanto a los tipos de sustancias tóxicas, según Lettinga (89) podemos diferenciar **inhibidores típicos** (causantes frecuentes de toxicidad como ácidos grasos volátiles, amonio o sulfuro de hidrógeno, etc.), **sales** (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , etc.), **compuestos naturales**, **contaminantes industriales** (solventes, pesticidas, surfactantes, colorantes, organohalogenados y metales pesados, entre otros) y **otras sustancias** (resinas ácidas, formaldehído, antibióticos, hidrocarburos clorados y algunos clorados, etc.) (15). No obstante, los principales compuestos tóxicos son, entre otros:

A) Cationes y Metales Pesados

La toxicidad o inhibición por acción de los metales se produce únicamente en su forma iónica (es decir, soluble) (88) a partir de ciertas concentraciones, las cuales serán mayores o menores en función de la toxicidad del metal, la cual aumenta con el peso molecular (35). Debido a ello, los cationes de metales alcalinos (Na, K) y alcalino-terreos (Ca, Mg) tienen un efecto estimulador a bajas concentraciones; si bien, a partir de cierta concentración pueden causar toxicidad. Por el contrario, los metales pesados (Zn, Cd, Fe, Cu, Ni, Cr, Pb) causan una mayor toxicidad a una menor concentración (35 y 90). No obstante, estas concentraciones varían en función de la bibliografía consultada (ver Anexo 5).

Concretamente, la toxicidad relacionada con los metales pesados ocurre debido a la unión de estos a diversas proteínas y/o enzimas de los microorganismos provocando la alteración de su estructura y función (91). No obstante, esta toxicidad se puede combatir induciendo su precipitación en forma de sales de sulfato o sales de carbonato, excepto en el caso del hierro y del cromo (87).

B) Ácidos grasos volátiles (AGV)

Los ácidos grasos volátiles, si se combinan con niveles bajos de pH (47), dan lugar a formas no ionizadas de los ácidos grasos volátiles que son inhibidores de gran importancia de las *archaeas* metanogénicas. (61).

C) Ácidos grasos de cadena larga

La inhibición causada por estos ácidos grasos ha sido poco investigada, proponiéndose que su toxicidad radica de su adsorción en la membrana o pared celular, creando una barrera que interfiere en mecanismos de transporte impidiendo la transferencia de sustratos y metabolitos a su interior, lo cual afectará también a otras funciones celulares (92–94). Parece ser que ciertos estudios indican que los más afectados son los organismos metanogénicos acetoclásticos; si bien, también afecta a los acetogénicos y metanogénicos en general (95).

D) Hidrógeno

El H_2 se genera como producto intermedio durante la digestión anaerobia, por lo que su acumulación en el reactor inhibe la Acetogénesis y, como consecuencia, ocasiona el aumento de la concentración de ácidos grasos volátiles con más de dos carbonos (87 y 35), sobre todo de propionato (82, 96 y 97). Además, otros autores han relacionado los altos valores de la presión de H_2 con el aumento de la fracción “iso” sobre la fracción “n” de los ácidos butírico y valérico (98).

E) Nitrógeno Amoniacal

El nitrógeno orgánico se hidroliza durante el proceso anaerobio produciendo formas amoniacales. Aunque el nitrógeno amoniacal es un importante nutriente para el crecimiento de los microorganismos cuya carencia puede provocar un fallo en la producción de biogás, una concentración excesivamente alta del mismo puede limitar el crecimiento de los microorganismos metanogénicos (especialmente los acetoclásticos); si bien, no afecta a los acidogénicos ni acetogénicos (69).

En principio, la forma que parece causar la inhibición o toxicidad por amonio (NH_4^+) es el amoníaco libre (NH_3), cuya concentración aumenta a pH alcalinos y a altas temperaturas (69). No obstante, tras consultar la bibliografía (60, 69, 73 y 99), vemos que no existe un consenso sobre la concentración a partir de la cual se producen estos efectos, lo cual se debe al fenómeno de aclimatación de los microorganismos y a que la concentración de amoníaco libre (NH_3) depende del pH y la temperatura utilizados en el reactor (73).

F) Sulfatos y sulfuros

Pueden inhibir particularmente la Metanogénesis. Cuando hay sulfatos en el medio, las bacterias metanogénicas y sulfato-reductoras compiten por el acetato e hidrógeno. En consecuencia, dado que las bacterias sulfato-reductoras normalmente exhiben ventajas termodinámicas y cinéticas sobre las metanogénicas, esto acaba afectando a la proporción de ácido sulfhídrico y metano en el biogás (69).

El sulfato es, además, un importante inhibidor cuyo efecto aumenta en función de la relación DQO/sulfato (habiendo signos de inhibición por debajo de un valor de 7-8) (100); así como de la concentración (concentraciones altas), la temperatura y el pH (temperatura y pH bajos) (69).

G) Fenoles

Varios autores indican que los fenoles inhiben el crecimiento de los organismos anaeróbicos (101–104). Los fenoles tienen un comportamiento reductor, lo que los hace tóxicos para la mayoría de los microorganismos presentes en la digestión (105).

H) Antibióticos, desinfectantes y pesticidas

Se ha visto que la presencia de penicilina y tetraciclina (procedentes de la dieta de los animales) en sustratos como, por ejemplo, el purín de cerdo, tiene un efecto inhibitorio sobre el proceso, aunque parece haber una buena aclimatación a la presencia de dichas sustancias (106 y 107). Sin embargo, otros antibióticos no han hecho efecto alguno.

Por otro lado, los pesticidas y desinfectantes también pueden llegar a afectar al proceso según su concentración (108).

6.4.– PARÁMETROS OPERACIONALES

6.4.1.– TEMPERATURA

La digestión anaerobia es posible teóricamente entre los 3°C y los 70° C aproximadamente, pudiéndose diferenciar entre tres rangos de temperatura de operación según Van Lier (109):

Psicrófilo: $T < 20^\circ\text{C}$

Mesófilo: $20^\circ\text{C} < T < 40^\circ\text{C}$

Termófilo: $T > 40^\circ\text{C}$

No obstante, algún autor (110) ha subdividido el último tramo de temperaturas estableciendo dos grupos: termófilos (hasta 65°C) e hipertermófilos (por encima de 65°C). Por otro lado, en función del autor consultado (10, 48, 57, 69, 73, 81 y 111–113) los valores límite de cada rango establecido varían $\approx 5\text{--}10^\circ\text{C}$; por lo que, de nuevo, se produce una falta de consenso en la bibliografía.

Independientemente de esto, todos los autores parecen coincidir en la importancia de la influencia de la temperatura en la digestión anaerobia, pues ésta afecta a las comunidades microbianas de los reactores (114 y 115); así como a la concentración de inhibidores (NH_3 , H_2 , H_2S , ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos volátiles, etc.) y a otros parámetros ambientales (como el pH) (69). Debido a ello, es importante elegir el rango de temperatura más adecuado para realizar el proceso:

- **Digestión psicrófila ($T < 20^\circ\text{C}$):** raramente se emplea, pues las bajas temperaturas hacen que disminuya la velocidad de crecimiento de los microorganismos; así como la actividad metanogénica, la cual puede decrecer hasta 20 veces con respecto a la que se produciría a 35°C según Rizvi (116).
- **Digestión mesofílica ($20^\circ\text{C} < T < 40^\circ\text{C}$):** la mayoría de los digestores convencionales funcionan en la gama mesofílica (37), situándose el valor óptimo entre los 25°C y 35°C (117 y 118).
- **Digestión termofílica ($T > 40^\circ\text{C}$):** también es frecuente efectuar la digestión anaerobia en la gama termofílica, cuya temperatura óptima ronda los 55°C (119). Esto se debe a que este tipo de digestión reporta una serie de ventajas como la mejora de la eliminación de patógenos (casi el 100% de los virus y bacterias patógenas; así como larvas) (10); higienización del residuo; eliminación de semillas de malas hierbas; mayor rapidez de reacción (37); agilización de la separación sólido-líquido; disminución de la viscosidad (10) y aumento de la velocidad de hidrólisis, lo cual da lugar a un aumento de la productividad y, por tanto, de la cantidad de biogás producido (120–123).

De todos estos tipos de digestión, la más utilizada, como ya hemos indicado, es la digestión mesofílica. La razón de ello es que, pese a que el rango termofílico presenta ciertas ventajas, se ha visto que es más inestable (124), pues favorece un aumento de concentración del nitrógeno amoniacal o de los ácidos grasos de cadena larga y, por tanto, de la toxicidad derivada de éstos (37, 54 y 125). No obstante, no todos los autores opinan lo mismo, ya que algunos consideran que la digestión termofílica es igual (126) o más estable que la mesofílica (114 y 115), además de aportar más ventajas; ya que indican que hay una mayor producción de gas por unidad de sólido volátil y una mejora en el postratamiento (126). Igualmente ocurre en el tratamiento de lodos, donde la temperatura del proceso determina la rapidez de la digestión anaerobia (127).

Por otro lado, una vez elegido el rango de temperatura al que va a operar el reactor, es necesario tener en cuenta que el proceso de digestión anaerobia es muy sensible a los cambios de temperatura, siendo esta sensibilidad mayor en función del rango de temperatura elegido (psicrófilo: $\pm 2^\circ\text{C}/\text{h}$ / mesófilo: $\pm 1^\circ\text{C}/\text{h}$ / termófilo: $\pm 0,5^\circ\text{C}/\text{h}$) (48). Pequeñas fluctuaciones no son inhibitoras del proceso de fermentación; no obstante, pueden reducir la velocidad de producción de biogás (128).

6.4.2.– AGITACIÓN

Al efectuar la digestión anaerobia en un digestor con bacterias en suspensión suele ser necesario un cierto grado de agitación (que mantenga la estabilidad del proceso) debido a que permite:

- Eliminación de los metabolitos producidos por las bacterias metanogénicas (es decir; gas) al favorecer la salida de los gases (35 y 129) con la agitación; ya que, de no aplicarla, estos pueden ser atrapados en forma de burbujas en el sustrato (73).
- Mezclado del sustrato fresco con la población bacteriana (71).
- Evitar la formación de costra dentro del digestor.
- Prevenir la formación de sedimentos en el reactor.
- Homogeneizar la densidad bacteriana del digestor con el fin de evitar la formación de espacios “muertos” sin actividad biológica que reducirían el volumen efectivo o útil del reactor
- Prevenir la formación de “natas” o “espumas” en la parte superior del digestor; ya que esto dificulta la salida del biogás.

- Distribución uniforme de la temperatura en el interior del biodigestor, evitando la estratificación.
- Distribución uniforme de los productos, tanto intermedios como finales (35).
- Distribución uniforme del sustrato con el fin de aumentar su disponibilidad (81); así como el contacto entre éste y las bacterias, evitando del mismo modo la formación de cúmulos alrededor de las bacterias (35).
- Reducción del tiempo de digestión (81).
- Prevenir la formación de caminos preferenciales en función de la hidráulica del sistema (129).

Para ello, se pueden utilizar varios tipos de sistemas de agitación:

- **Agitación Mecánica:** ejercida por agitadores manuales o con motores eléctricos. En principio, según Hernández Muñoz (119), aplicar velocidades de agitación superiores a 60 rpm mejora la eficiencia del proceso y si, además, supera las 90 rpm, se consigue eliminar la formación de espumas. Por otro lado, según Trisakti et al. (130), a 100 rpm es cuando se alcanza la mejor degradación de las sustancias orgánicas, además de mejorar tanto la producción como la composición del biogás.
- **Agitación Hidráulica:** ejercida por bombas de flujo lento que provocan la recircularización de la biomasa.
- **Agitación Neumática:** consiste en la recircularización del biogás generado a lo largo del proceso con el fin de producir un burbujeo desde el fondo del reactor que favorezca el movimiento de la biomasa (35). En principio, este tipo de agitación es la que presenta mayores ventajas por sus efectos en el reactor, así como por su sencillez en operación y diseño (131).

A la hora de seleccionar el sistema de agitación; así como la frecuencia e intensidad, es necesario tener en cuenta que la producción de biogás es el resultado de un equilibrio simbiótico entre varios microorganismos, por lo que su alteración supondría una reducción de la producción de biogás (35). Debido a ello, es necesario que la agitación sea moderada con el fin de asegurar simultáneamente una buena homogeneización del medio y una correcta formación de agregados bacterianos (132). Esto se debe a que diversos autores indican que una agitación excesiva provoca que las diferentes especies microbianas estén demasiado próximas entre sí, lo cual dificulta el intercambio interespecífico de hidrógeno tan importante para el sintrofismo característico de la digestión anaerobia (59 y 133–136).

Finalmente, en cuanto a la potencia necesaria para llevar a cabo la agitación, esta se encuentra comprendida entre 10 y 100 W·h/m³·día (aunque se suelen recomendar valores superiores a 30 W·h/m³·día) (71 y 65).

6.4.3.– TIEMPO DE RETENCIÓN

En principio, podemos diferenciar los siguientes tipos de tiempos de retención:

- **Tiempo de Retención Hidráulico (TRH):** es el tiempo medio de permanencia del influente en el reactor necesario para producir los niveles de energía prefijados gracias a la acción de los microorganismos presentes en el reactor (47) y está relacionado directamente con el tiempo medio que la biomasa pasa retenida en éste (57). Puede calcularse como (47):

$$\text{TRH (días)} = \frac{V (m^3)}{Q (m^3/\text{día})}$$

- **Tiempo de Retención Celular (TRC) o Tiempo de Retención de Sólidos (TRS):** es el tiempo medio que los microorganismos pasan en el reactor y se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{TRC (días)} = \frac{M (kg)}{M (kg) / T (\text{días})}$$

En principio, el TRH y el TRC son iguales en digestores de mezcla completa (65); ya que existe una única fase en el reactor y por ello sería más adecuado utilizar el concepto de Tiempo de Retención (RT)

(57). No obstante, esto no ocurre en reactores con sistemas de retención de sólidos, pues en este caso el TRC será mayor que el TRH (el cual puede presentar un valor inferior al que tendría en un reactor de mezcla completa para la misma eficiencia).

De manera general, el tiempo de retención es un parámetro muy importante en lo referente a la productividad del biogás (137), pues, para que se inicie el proceso, se necesita un “tiempo mínimo de retención de sólidos” (variable en función del sustrato, la temperatura, el clima (47), el tipo de reactor y los aspectos cinéticos (65)); ya que a tiempos de retención inferiores se produce la inhibición del proceso). Hassan AN. y Nelson BK. (138) consideran que esto pudiera deberse a que, a tiempos de retención cortos, se produce la acumulación de ácidos grasos volátiles como consecuencia del arrastre de los microorganismos metanogénicos; ya que estos presentan un crecimiento muy lento y tardan en regenerarse (81), provocando la acumulación de acetato y el aumento de la presión parcial H_2 . De este modo, se produce la inhibición de las bacterias acetogénicas, responsables de la degradación de los ácidos grasos volátiles, lo cual explica su acumulación (35) y la inhibición del proceso.

Una vez superado este tiempo mínimo, a medida que aumenta el tiempo de retención, aumenta la tasa de eliminación de materia orgánica biodegradable y, por tanto, también la producción volumétrica de biogás (m^3 biogás/ m^3 reactor·día). No obstante, esto solo ocurre hasta cierto punto o tiempo de retención óptimo (en el cual se alcanza la producción máxima); ya que, una vez sobrepasado, la productividad volumétrica de biogás comienza a disminuir, hecho que no ocurre con la tasa de eliminación de materia orgánica (65) (ver Anexo 6). En consecuencia, es necesario seleccionar un tiempo de retención óptimo o adecuado que, como ya hemos dicho antes, dependerá del sustrato a tratar, la temperatura, el clima (47), el tipo de reactor y aspectos cinéticos (65); si bien, vamos a centrarnos en los tres primeros:

A) Tiempo de retención en función de la temperatura

Como ya hemos explicado anteriormente en este TFG, el aumento de la temperatura incrementa la velocidad de la digestión anaerobia y, por tanto, disminuye el tiempo de retención necesario para realizar el proceso (139), lo cual resulta ventajoso. No obstante, hay que tener en cuenta que temperaturas muy elevadas también pueden provocar un incremento de los requerimientos energéticos y de la inestabilidad del proceso.

Por otro lado, cuanto mayor es la duración del tiempo de retención, menor es el efecto de la temperatura sobre el proceso; es decir, que la diferencia entre las velocidades de degradación a diferentes temperaturas disminuye (132).

B) Tiempo de retención en función del sustrato

De manera general, los sustratos ricos en azúcares y almidón o materia orgánica soluble son fáciles de digerir, de modo que el tiempo de retención requerido será menor (140). Por el contrario, los sustratos ricos en moléculas resistentes, como la celulosa, presente en materia vegetal, tendrá mayor tiempo de retención (35).

Centrándonos en el rango mesófilo (que es el más utilizado), algunos ejemplos de valores de tiempo de retención son:

- **Estiércol de vaca o de gallina:** 20-40 días
- **Mezcla de estiércol de animal y material vegetal:** 50-80 días (71).
- **Estiércol de cerdo:** 15-25 días

Otros autores, sin especificar el sustrato, fijan el plazo en 20 a 30 días (141).

Tabla 3 Tiempos de retención en la fermentación anaerobia en función de la temperatura

| TIEMPO DE RETENCIÓN EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA | |
|-----------------------------------------------------|---------------------|
| TIPO DE DIGESTIÓN EN FUNCIÓN DE Tª | TIEMPO DE RETENCIÓN |
| Psicrófila ($T < 20^{\circ}C$) | > 100 días |
| Mesófila ($20^{\circ}C < T < 40^{\circ}C$) | 15-60 días |
| Termófila ($T > 40^{\circ}C$) | 10-15 días |

Fuente: adaptación de Bautista Buhigas A. Sistema biodigestor para el tratamiento de desechos orgánicos [Trabajo Fin de Grado] [Madrid]: Universidad Carlos III; 2010.

C) Tiempo de retención en función del clima de la región geográfica

- **Clima tropical con regiones planas** (Indonesia, Venezuela, América Central, etc.): 30 – 40 días
- **Regiones cálidas con inviernos fríos cortos** (India, Filipinas, Etiopía, etc.): 40 – 60 días
- **Clima templado con inviernos fríos** (China, Corea, Turquía, etc.): 60 – 90 días (35)

6.4.4.– VELOCIDAD DE CARGA ORGÁNICA

La velocidad de carga orgánica (VCO) es la cantidad de materia orgánica presente en el sustrato que se introduce diariamente en el digestor por unidad volumétrica del reactor y unidad de tiempo (35, 69 y 142). Podemos calcularla de la siguiente manera (69 y 142):

| | | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $VCO = \frac{Q \cdot [C]}{V_r} = \frac{[C]}{TR}$ | <ul style="list-style-type: none">• V_r = Volumen líquido del reactor (m³)• [C] = Concentración de materia orgánica del sustrato (kg DQO o SV/ m³·día) | <ul style="list-style-type: none">• Q = Caudal (m³ /día)• TR = Tiempo de retención (días) |
| <ul style="list-style-type: none">• VCO = Velocidad de Carga Orgánica (kg DQO o SV/ m³·día) | | |

Por tanto, como podemos ver, la VCO depende tanto de la concentración de sustrato como del tiempo de retención.

Inicialmente, conforme aumenta la VCO, crece la producción del biogás; si bien, también se produce un incremento de los ácidos grasos volátiles (AGV). En consecuencia, a VCOs altas, la actividad hidrolítica/acidogénica es mucho mayor que la actividad metanogénica; por lo que comienza a producirse una gran cantidad de AGVs, H₂ y acetato. No obstante, los microorganismos metanogénicos no pueden convertir todo este acetato y H₂ en metano, lo cual acaba provocando su acumulación y, en consecuencia, la acumulación de AGVs. Como resultado, se produce una acidificación irreversible y la disminución del pH del reactor, derivando en la inhibición del proceso (123 y 143) (ver anexo 7).

Sin embargo, si la VCO sigue aumentando, existe un cierto valor a partir del cual la producción de AGV se estanca e, incluso, disminuye su concentración a causa de un fallo en la acidogénesis (143 y 144).

Por ello, teniendo en cuenta todo lo dicho anteriormente, será necesario seleccionar una VCO óptima (la cual variará según las características reológicas de los sustratos) (145) que nos permita obtener una buena producción de biogás sin que se produzca la inhibición del proceso por AGV.

6.4.5.– RELACIÓN CARBONO/NITRÓGENO

En principio, casi toda la materia orgánica puede ser utilizada por los microorganismos para producir biogás mediante digestión anaerobia; si bien, la calidad del biogás producido será diferente en función del sustrato utilizado, especialmente de la relación C/N, pues estos constituyen la principal fuente de alimentación de los microorganismos metanogénicos responsables de la producción del biogás (35).

Concretamente, los organismos que descomponen la materia orgánica utilizan el carbono como fuente de energía y el nitrógeno para la formación de su estructura celular; es decir, es necesario para su crecimiento y división. Por tanto, necesitan una mayor cantidad de carbono que de nitrógeno (146) para sobrevivir y realizar sus funciones.

Debido a lo explicado anteriormente, para que las *archaeas* metanogénicas realicen su función, es necesario que el sustrato utilizado presente una relación C/N de 30:1, debido a que los microorganismos consumen 30 veces más carbono que nitrógeno; si bien, según Khalid et al (147), otra ratio C/N posible sería 20:1 o, incluso, 15:1 según Speece (148). De este modo, según Varnero Moreno (35), “*la descomposición de materiales con alto contenido de carbono, superior a 35:1, ocurre más lentamente, porque la multiplicación y desarrollo de bacterias es bajo, por la falta de nitrógeno, pero el período de producción de biogás es más prolongado.*” Por otro lado, Varnero Moreno también afirma que “*con*

una relación C/N menor de 8:1 se inhibe la actividad bacteriana” lo cual se debe a que, durante el proceso anaerobio, el nitrógeno orgánico es hidrolizado dando lugar a formas amoniacales y, aunque el nitrógeno amoniacal es un nutriente importante para el crecimiento bacteriano (74), una concentración excesiva causa toxicidad y limitación del crecimiento de la población metanogénica (15), provocando la inhibición de la producción del biogás.

Por ello, es importante que el sustrato a digerir presente un buen ratio C/N para que la cantidad de nitrógeno presente sea adecuada con el fin de evitar la limitación de nutrientes (poco nitrógeno) o la toxicidad por amoníaco (demasiado nitrógeno), permitiendo, en consecuencia, una buena estabilización de los reactores (71, 149 y 150) (ver anexo 8). No obstante, en caso de que el sustrato no tenga una C/N adecuada de partida, una forma de equilibrar esta relación es mediante mezclas de residuos con relaciones C/N diferentes (codigestión) (71 y 149).

7.– MEJORA DE LA PRODUCTIVIDAD

A continuación, vamos a tratar de manera resumida lo publicado acerca de cuatro posibles líneas de mejora de la producción de biogás que resultan interesantes para complementar la digestión anaerobia o, incluso, como alternativa (como es el caso de la codigestión anaerobia). Concretamente, las líneas a tratar son:

- | | |
|--------------------------------|--------------------|
| 1. Codigestión anaerobia | 3. Bioestimulación |
| 2. Pretratamiento del sustrato | 4. Bioaugmentación |

7.1 – CODIGESTIÓN ANAEROBIA

En principio, aunque nuestro TFG está centrado en la digestión anaerobia, es importante mencionar la existencia de la codigestión anaerobia, la cual consiste en someter simultáneamente al proceso de digestión anaerobia a dos residuos orgánicos de diferente naturaleza: el sustrato principal (residuo que se encuentra en mayor proporción) y el cosustrato (residuo que se encuentra en menor proporción) (1). La razón de esta mención es que la codigestión anaerobia constituye una muy buena alternativa al proceso de digestión anaerobia, pues presenta una gran cantidad de beneficios o ventajas económicas, operacionales y medioambientales:

- 1) Aumento del rendimiento metanogénico durante la producción de biogás, así como de la propia producción de biogás, gracias a la complementariedad de los residuos tratados (57).
- 2) Aumenta la estabilidad del digerido (151) y de los procesos, lo cual se piensa que podría deberse a que el cosustrato actúa como una especie de agente diluyente de sustancias inhibitoras o potencialmente tóxicas como NH_3 , Na^+ (151–153), K^+ , H_2S , NH_4^+ o polifenoles (154). Esto permite incrementar la carga orgánica en el digestor y aprovechar mejor su volumen (151 y 155).
- 3) Resulta exitosa tanto en régimen termofílico como mesofílico (81).
- 4) Mayor reducción de emisiones de gases de efecto invernadero a la atmósfera (151).
- 5) Posibilita la digestión de residuos cuyo tratamiento no es viable (p.ej, el glicerol crudo) o es problemático (p.ej. residuos de matadero, de frutas y de verduras) si se lleva a cabo de manera aislada (156 y 157).
- 6) La diversificación de los sustratos favorece el desarrollo de una comunidad microbiana más versátil y robusta (154).
- 7) Permite unificar la gestión, aumentar el aprovechamiento del equipo y reducir costes de inversión y explotación (81 y 151).
- 8) Mejora del contenido de nutrientes del producto final, haciéndolo más interesante como fertilizante para suelos (158).

De hecho, ya en los años 90, los investigadores se percatan de estas mejoras y, desde entonces, el número de artículos referentes a la codigestión anaerobia ha seguido aumentando, especialmente desde los años 2004 a 2019 (ver anexo 9). No obstante, el número de artículos referentes a la digestión anaerobia sigue siendo muy superior, lo cual es un indicativo de que todavía queda bastante por investigar en lo referente a la codigestión anaerobia; si bien es un cambio muy prometedor.

De hecho, la codigestión anaerobia resulta tan interesante que, en la práctica, está comenzando a sustituir a la mono-digestión anaerobia, pues, como ya hemos dicho, se ha visto que la combinación de sustratos ofrece mejores resultados y permite la rentabilización económica de plantas dedicadas al tratamiento de sustratos con baja productividad de biogás como, por ejemplo, los residuos agroindustriales; ya que consigue aumentar la eficacia del proceso del 30% a más del 100% (154).

Normalmente, según los datos obtenidos a partir de Scopus, el sustrato principal de los procesos de codigestión anaerobia suelen ser las aguas residuales, seguidas de los residuos ganaderos (ver anexo 10); siendo estos últimos una buena base para la codigestión según Mata-Alvarez y Dosta (154) ya que, *“generalmente, presentan un contenido en agua elevado, una alta capacidad tampón y aportan una amplia variedad de nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos anaerobios”*. Por otro lado, los cosustratos más frecuentes con los que se suele mezclar son los cultivos energéticos (por ejemplo, maíz, cereales, caña de azúcar, etc.); ya que, según Muzenda (140) puede aumentar la recuperación de metano en un 16-65%. No obstante, también se pueden añadir otro tipo de cosustratos.

Algunos ejemplos de mezclas utilizadas en la codigestión según González y Jurado (159) son:

- **Estiércol y material lignocelulósico:** Cestenaro et al. (160) nos indican una mejora en la producción de biogás en un 50% como resultado de la combinación de estiércol de ganado y contenido del lecho de las ovejas, que consistía en cáscara de arroz (material lignocelulósico) mezclada con heces de animales.
- **Estiércol de vaca y rábano forrajero:** otros autores indican que al añadir rábano forrajero se produce una mejora del 67% en la producción de CH₄ en el biogás con respecto a la concentración que se obtendría solo con estiércol de vaca (161).
- **Estiércol de vaca y melaza:** otros investigadores indican que esta mezcla permitió obtener una buena producción de biogás, ya que la melaza de remolacha es un sustrato muy biodegradable (162).
- **Estiércol de ganado y paja de trigo triturada:** otros autores informan que al añadir paja de trigo triturada al estiércol se incrementó la producción de CH₄ en un 33% y 158% en términos de volumen (163).
- **Estiércol y Residuos fácilmente biodegradables como co-sustrato:** otros resultados obtenidos por Buendía IM. et al. (164) indican que, añadiendo residuos fácilmente biodegradables obtenemos una producción superior de biogás.

No obstante, aquí solo hemos citado algunos de los ejemplos recogidos por González y Jurado (159); si bien, en realidad, existen muchos artículos (los cuales no podemos reproducir aquí por falta de espacio) en los cuales se incluyen mejoras de producción mediante el uso de una gran variedad de sustratos y cosustratos diferentes con distintas condiciones de operación, así como rendimientos. Por tanto, lo que esto nos ha permitido es evidenciar la falta de uniformidad en cuanto a las condiciones operacionales utilizadas y a las mezclas de sustratos, lo cual dificulta enormemente extraer conclusiones sobre qué mezcla ofrece un mejor rendimiento. No obstante, a grandes rasgos, lo que podemos extraer de todos estos artículos es que la codigestión de estiércol de ganado y residuos vegetales lignocelulósicos es lo más habitual.

7.2– PRETRATAMIENTO DEL SUSTRATO

Normalmente, el pretratamiento se realiza con el fin de destruir microorganismos patógenos, eliminar los compuestos no biodegradables, concentrar el contenido de materia orgánica y acondicionar el sustrato previamente al proceso de digestión (140).

De este modo, el pretratamiento (ya sea mecánico, físico-químico o biológico) de los sustratos aumenta su homogeneidad, así como su disponibilidad para la acción de los microorganismos, lo cual resulta de gran interés para conseguir un elevado rendimiento en biogás; especialmente en el caso de sustratos complejos de carácter recalcitrante, como los residuos agrícolas (cáscaras de frutas o frutos secos, hojas, melazas, productos derivados del procesamiento de árboles, etc.). Esto se debe a que este tipo de sustratos presenta una elevada composición en lignina, hemicelulosa y celulosa, lo cual dificulta su hidrólisis y su digestión por parte de los microorganismos. Sin embargo, este problema puede solucionarse mediante un pretratamiento adecuado, siendo esto bastante útil, pues los residuos agrícolas son muy interesantes, ya que no solo constituyen una fuente barata de carbohidratos; sino que, además, constituyen la materia prima más habitualmente disponible (165).

7.3– BIOESTIMULACIÓN.

La bioestimulación de la digestión anaerobia consiste en la adición de nutrientes al sustrato a digerir con el fin de estimular la acción de los microorganismos y, en consecuencia, mejorar la biodegradación, consiguiendo, como resultado, una mayor producción de biogás. Por tanto, para garantizar un buen rendimiento del proceso anaerobio, es necesaria la bioestimulación mediante la adición de macro y micronutrientes.

7.3.1– MACRONUTRIENTES

El N, P, K y Mg, entre otros, son macronutrientes requeridos por los microorganismos responsables de la digestión anaerobia para poder realizar su función. En consecuencia, la adición o ajuste de la concentración de estos compuestos en el medio hasta un valor adecuado supondrá un aumento del rendimiento del proceso (123).

7.3.2– MICRONUTRIENTES.

La adición de micronutrientes (vitaminas, minerales y/u oligoelementos) resulta de gran importancia, pues, en muchos casos, no están presentes de manera natural en el sustrato utilizado o su presencia es deficiente. Además, dado que son esenciales para la nutrición de las *archaeas* metanogénicas (166), su presencia en el sustrato es fundamental para la producción de biogás en la digestión anaerobia.

De hecho, se ha observado que la adición de una pequeña cantidad de diversos oligoelementos, como es el caso del Fe (aumenta la transformación de acetato en metano, así como la producción de biogás (167)), Ni (es el micronutriente que tiene más significación en la producción de biogás (168)), Co, W, Cu (tiene efectos positivos al reducir sulfatos (169)), Mo, etc. aumenta la producción de biogás. Así, por ejemplo, se ha visto que:

- La adición de Se y Co es esencial para la digestión anaerobia de deshechos alimenticios u operar a altas concentraciones de amonio (123).
- La adición de iones de Cu^{+2} , Ni^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} a bajas concentraciones tiene efectos positivos en la producción de biogás *in vitro* (170).
- La adición de Se y Co es esencial para la digestión anaerobia de deshechos alimenticios u operar a altas concentraciones de amonio.
- La adición de una mezcla de Fe, Ni y Co junto con el macronutriente Ca permite la eliminación casi total de los ácidos grasos de cadena larga, evitando su acumulación y evitando la inhibición del proceso (123).

- La adición de ácido nitriloacético (NTA) promueve la producción de metano al actuar como quelante de metales traza, lo cual provoca, como resultado, un aumento de la biodisponibilidad de Co y Ni (171).
- La adición de elementos como Ni, Co, W y Mo produce un aumento del rendimiento del proceso al formar parte de los cofactores (F₄₂₀, F₄₃₀, F₄₃₂) de enzimas claves en la ruta bioquímica de la producción de metano (172).

Por otro lado, según Pereda Reyes et al. (169), la adición de vitaminas parece estimular el crecimiento de las bacterias metanogénicas y, por tanto, el rendimiento del proceso.

7.4– BIOAUMENTACIÓN

La bioaumentación consiste en la adición de microorganismos seleccionados específicamente para degradar determinados compuestos con el fin de mejorar la degradación del sustrato utilizado y, en consecuencia, la producción de biogás. No obstante, el método por el cual estos microorganismos favorecen el proceso es diferente; ya que pueden utilizarse para:

- **Favorecer la degradación de la lignina, celulosa y hemicelulosa procedente de residuos agro-industriales y aumentar la producción de biogás:** para ello, se suelen adicionar microorganismos lignocelulolíticos, celulolíticos y/o hemicelulolíticos procedentes de diversos inóculos (lodos procedentes de digestores anaerobios, muestras de materiales lignocelulósicos podridos, estiércol de ganado, etc.) (165).
 - En un experimento se trató paja de maíz con un consorcio de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis* y *Hansenula anomala*), que se usan normalmente para romper la estructura cristalina y no cristalina de la celulosa; bacterias celulolíticas (*Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis*. y *Pleurotus Florida*) y bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus deiliehii*), obteniendo un aumento del 76% en la producción de biometano con respecto al control, así como una reducción del tiempo de digestión del 36% (173).
 - Otros autores informan de que, gracias al pretratamiento de residuo de yuca con una comunidad microbiana recogida a partir de materiales lignocelulósicos podridos, se produjo un aumento de la producción de biometano del 97% como consecuencia del aumento de la degradación de lignina; así como de la celulosa y hemicelulosa por acción de dicha comunidad (174).
- **Favorecer la conversión de ácidos grasos de cadena larga en acetato:** de este modo, se evita su acumulación favoreciendo un aumento de la producción de biogás; ya que, como hemos comentado previamente en este TFG, su acumulación puede llegar a inhibir el proceso. Para ello, se han adicionado algunos microorganismos como *Syntrophomonas Zehnderi* (microorganismo acetógeno asociado a lípidos) o *Clostridium lundense* (bacteria lipolítica), resultando especialmente interesante *Syntrophomonas Zehnderi*, pues en un experimento se vio que su adición aumentó la producción de biometano un 66%, por si sola, y hasta un 200%, al añadir Sepiolita al inóculo (175).
- **Regular la presión de H₂, evitar la inhibición por amonio y superar la toxicidad transitoria por presencia de O₂** mediante la adición de microorganismos metanogénicos hidrogenotróficos como, por ejemplo, *Acetobacteroides hydrogenigenes* (176) o *Enterobacter cloacae* (177).
- **Reducir el tiempo necesario de recuperación tras una sobrecarga de materia orgánica** mediante bioaumentación con microorganismos metanogénicos aerotolerantes y anaerobios, lo cual, según Tale et al. (178), permitió un aumento de la producción de biometano del 50% al 120%.
- **Mejorar la metanogénesis mediante la adición de metanógenos:** se recomienda la adición de bacterias del género *Methanosarcina*, al ser más resistentes al estrés, más eficientes y de crecimiento más rápido que *Methanoseata*. De hecho, en un experimento en el cual se acopló una cepa de

Methanosarcina sp con *Clostridium* sp. (bacteria xilanolítica), utilizando xilosa como materia prima, se obtuvo un incremento de la formación de biogás del 140% (179).

Por otro lado, según Nzila (165), también se ha planteado el uso de microorganismos genéticamente modificados; si bien, las investigaciones referentes a la aplicación de dichos microorganismos en procesos anaerobios son bastante limitadas. De hecho, tras realizar una búsqueda en Scopus, tan solo encontramos 27 artículos relacionados con la aplicación de este tipo de microorganismos en la digestión anaerobia para distintos fines, dentro de los cuales, únicamente 7 artículos se relacionan con la producción de biogás. Además, de estos 7 artículos, solo 5 son artículos experimentales; ya que los otros 2 son revisiones bibliográficas (una de 2019 y otra de 2017). Vemos, por tanto, que este campo todavía está bastante inexplorado.

Finalmente, también se ha investigado sobre la posible utilidad de las nanopartículas y los nanomateriales en este proceso (de hecho, este campo ha sido mucho más estudiado que el anterior, con un total de 89 artículos). En principio, los resultados varían en función de la concentración y el tipo de nanomaterial utilizado, pudiendo producir efectos tanto positivos como negativos. No obstante, el nanomaterial que mayor éxito ha tenido ha sido el nano-óxido de hierro, mostrando un aumento del 234% en la formación de biogás (180 y 181).

8.- CONCLUSIÓN

Una vez realizada la revisión bibliográfica, debemos destacar la inexistencia de uniformidad en cuanto a la información publicada actualmente en lo referente a las condiciones de operación, el tipo de reactor, el sustrato, el pretratamiento, etc. utilizados en la digestión anaerobia. Esto provoca que la comparación del rendimiento y eficiencia de la producción de biogás resulte complicada o, incluso, que carezca de sentido; ya que todos estos factores condicionan, a su vez, una gran diversidad de variables que causan grandes diferencias en cuanto a la cantidad de biogás obtenida, así como en cuanto a su composición. Además, en muchos artículos, los parámetros de producción no aparecen debidamente detallados, los volúmenes de biogás hallados no están en las mismas unidades y ni siquiera existe un consenso en el modo de calcular la eficiencia de la digestión, pasando de fórmulas muy simples a otras complejas, lo que obliga al investigador bibliográfico a efectuar muchos cálculos para tratar de ofrecer los mejores resultados.

Pese a esta falta de uniformidad, en este TFG hemos tratado de determinar las condiciones de operación y los aspectos más importantes a tener en cuenta para conseguir una buena producción de biogás:

Tabla 4 Resumen de las condiciones y aspectos operacionales más relevantes

| FACTORES AMBIENTALES | NUTRIENTES | | INHIBIDORES |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------|
| pH _{óptimo} próximo a la neutralidad | N = 80 – 120 g/ Kg biomasa | P = 10 – 25 g/ Kg biomasa | [AGV] < 3000 – 5000 mg acético /L |
| Alcalinidad _{óptima} = 2000 – 3000 mg CaCO ₃ /L | S = 10 – 25 g/ Kg biomasa | Fe = 5 – 15 g/ Kg biomasa | [AGV] _{óptima} = 50 – 500 mg acético/L |
| Potencial Redox = – 220 mV a – 350 mV | C:N:P _{óptima} = 100:1,75:0,25 | C/N _{óptima} = 30:1 | DQO/Sulfato > 7 – 8 |
| T _a _{óptima} ≈ 25°C – 35°C | C:N:P:S _{óptima} = 600:15:5:1 | C/P _{óptima} = 150:1 | |

Fuente: elaboración propia a partir de toda la información recopilada a lo largo de este TFG

Por otro lado, en cuanto a la mejora de la productividad del proceso y su aplicación a nivel industrial, consideramos que el sustrato más adecuado para la producción de biogás son los residuos agroindustriales lignocelulósicos, ya que están fácilmente disponibles y son una fuente barata de carbohidratos (los cuales generan un buen rendimiento en cuanto a la producción de biogás, aunque inferior a las grasas). Además, aunque la degradación de este tipo de sustratos no es tan directa como la de otros sustratos, resulta muy interesante, puesto que permite aprovechar al máximo los recursos (que

cada vez son más limitados) y reducir la contaminación al disminuir el número de residuos producidos por el ser humano y, además, al aprovecharlos para generar una fuente de energía renovable y más limpia que los combustibles fósiles. Asimismo, evitaríamos que el precio de los alimentos que se pueden utilizar para producir este tipo de biocombustibles aumentase (como ocurre, por ejemplo, con la producción de etanol a partir de maíz), ya que se estarían utilizando residuos.

Por tanto, una vez elegido el sustrato más adecuado, en base a la información recopilada, pensamos que lo más ventajoso sería realizar una co-digestión anaerobia (en vez de una mono-digestión) mezclando este sustrato con estiércol de ganado, ya que esto no solo incrementa la eficacia del proceso del 30% a más del 100%; sino que, además, nos permite reducir también la contaminación derivada de los residuos ganaderos.

Asimismo, es importante destacar que, dado que tanto la digestión anaerobia como la co-digestión anaerobia son el resultado de la acción de los microorganismos, la **Bioestimulación** resulta una estrategia muy interesante; especialmente la adición de algunos micronutrientes fundamentales como el hierro, el cobre y, sobre todo, el níquel, ya que es el que presenta una mayor significación en la producción de Biogás. Además, en base a la importancia de estos metales traza, resulta ventajosa la adición de ácido nitriloacético (NTA), al actuar como quelante de dichos compuestos y aumentar su biodisponibilidad. Finalmente, también se ha visto que la adición de cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2}) a bajas concentraciones, así como una fuente de hidrógeno podría resultar favorable.

Por otro lado, es recomendable la realización de un pretratamiento o, incluso, recurrir a la bioaumentación mediante adición de inóculos de microorganismos lignocelulolíticos, celulolíticos y/o hemicelulolíticos, ya que mejoran bastante el rendimiento del proceso. Concretamente, podemos destacar bacterias como *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis*, y *Pleurotus Florida*, *Lactobacillus deiliehii*, *Syntrophomonas zehnderi* o *Clostridium sp*; al igual que algunas levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis* y *Hansenula anomala*, ya que todas ellas han dado muy buenos resultados. Así mismo, también es muy interesante la combinación de estos microorganismos con microorganismos metanogénicos del género *Methanosarcina*; ya que esto permite mejorar enormemente la producción de metano y biogás.

Por último, cabe destacar que actualmente se están investigando nuevos campos que puedan mejorar la producción del proceso como es el caso de la adición de nano-partículas (donde la utilización de **nano óxido de hierro** ha dado unos resultados muy interesantes) y de microorganismos genéticamente modificados; si bien, todavía queda mucho por investigar en ambos campos.

9.- CONCLUSIONS

After carrying out the literature review, the first thing that is important to review is the zero uniformity of the information currently published regarding the operating conditions, the type of reactor, the substrate, the pretreatment, etc. used in anaerobic digestion, which makes the comparison of the yield and efficiency of biogas production complicated or even meaningless; since all these factors condition, in turn, a great diversity of variables that cause large differences in the amount of biogas obtained; as well as its composition. In addition, in many articles, the production parameters do not appear properly detailed, the volumes of biogas found are not in the same units and there is not even a consensus on how to calculate the efficiency of digestion, moving from very simple formulas to others complex, forcing the bibliographic researcher to perform many calculations to try to offer the best results.

Despite this lack of uniformity, in this TFG we have tried to determine the operating conditions and the most important aspects to consider in order to achieve a good biogas production:

Tabla 5 Summary of the most relevant operational conditions and aspects

| ENVIRONMENTAL FACTORS | NUTRIENTS | | INHIBITORS |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Optimum pH near neutrality | N = 80 – 120 g/ Kg biomass | P = 10 – 25 g/ Kg biomass | [VFA] < 3000 – 5000 mg acetate /L |
| Optimum Alkalinity = 2000 – 3000 mg CaCO ₃ /L | S = 10 – 25 g/ Kg biomass | Fe = 5 – 15 g/ Kg biomass | Optimum [VFA] = 50 – 500 mg acetate/L |
| Redox Potential = – 220 mV to – 350 mV | Optimum C:N:P = 100:1,75:0,25 | Optimum C/N = 30:1 | COD/Sulfate > 7 – 8 |
| Optimum Temperature ≈ 25°C – 35°C | Optimum C:N:P:S= 600:15:5:1 | Optimum C/P = 150:1 | |

Source: own elaboration from all the information collected throughout this TFG

On the other hand, in terms of improving the productivity of the process and its application at the industrial level, we consider that the most suitable substrate for biogas production is lignocellulosic agroindustrial wastes; since they are readily available and a cheap source of carbohydrates (which generate a good yield in terms of biogas production, although lower than fats). In addition, although the degradation of this type of substrates is not as direct as the degradation of other substrates, it is very interesting; since it allows to take full advantage of resources (which are increasingly limited) and reduce pollution by reducing the number of waste generated by humans and, in addition, by taking advantage of them to generate a renewable and cleaner energy source than fossil fuels. We would also prevent the price of food that can be used to produce this type of biofuel from increasing (as is the case, for example, with the production of ethanol from corn); since we would be using waste.

Therefore, once the most appropriate substrate has been chosen, based on the information collected, we think that the most advantageous would be to perform anaerobic co-digestion (instead of a mono-digestion) by mixing this substrate with cattle manure, since this not only increases the efficiency of the process from 30% to more than 100%; It also allows us to reduce pollution from livestock waste. It is also important to note that, since both anaerobic digestion and anaerobic co-digestion are the result of the action of microorganisms, biostimulation is a very interesting strategy; especially the addition of some fundamental micronutrients such as iron, copper and, above all, nickel; since it is the one that presents the greatest significance in the production of Biogas. Furthermore, based on the importance of these trace metals, the addition of nitriloacetic acid (NTA) is advantageous, by acting as a chelator of said compounds and increasing their bioavailability. Finally, it has also been seen that the addition of cations (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺) at low concentrations, as well as the addition of an hydrogen source could be favorable.

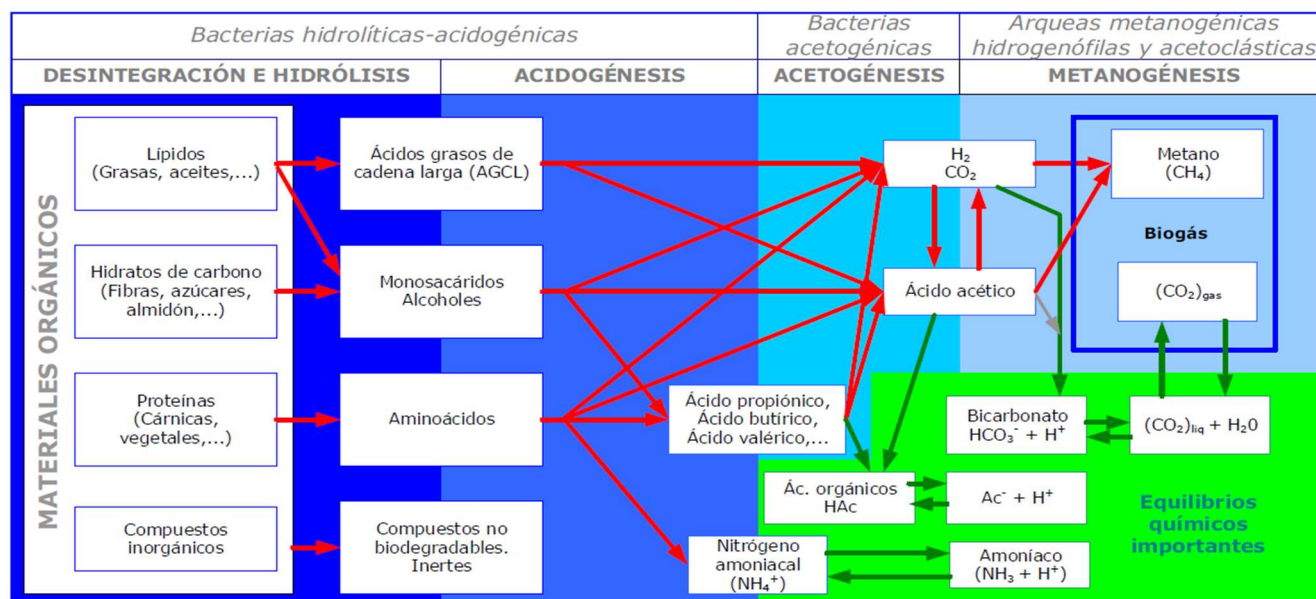
On the other hand, it is advisable to perform a pretreatment or even resort to bioaugmentation by adding inoculums of lignocellulolytic, cellulolytic and / or hemicellulolytic microorganisms; since they greatly improve the process performance. Specifically, bacteria such as *Bacillus licheniformis*, *Pseudomonas* sp., *Bacillus subtilis*, and *Pleurotus Florida*, *Lactobacillus deiliehii*, *Syntrophomonas zehnderi* or *Clostridium* sp; and yeasts such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Coccidioides immitis* and *anomalous Hansenula*, since all of them have given very good results. Likewise, the combination of these microorganisms with methanogenic *archaea* of the genus *Methanosarcina* is also very interesting; since this allows to greatly improve the production of methane and biogas.

Finally, it should be noted that new fields are currently being investigated that can improve the production of the process, such as the addition of nano-particles (where the use of nano-iron oxide has given very interesting results) and of microorganisms genetically modified; although, there is still much to investigate in both fields.

10.– ANEXOS

ANEXO 1

Figura 3 Representación esquemática de las fases de la digestión anaerobia






Fuente: Flotats X. Biogas: perspectives of an old technology. En: Bastidas-Oyanedel JR, Schmidt J, editores. Biorefinery Integrated Sustainable Processes for Biomass Conversion to Biomaterials, Biofuels, and Fertilizers [Internet]. Springer Nature; 2019. p. 313–349. [Consultado el 10 de noviembre de 2019] Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_13

ANEXO 2

En cuanto a las ventajas y desventajas de la digestión anaerobia, existe una extensa y variada bibliografía. Con respecto a las ventajas, a continuación, recogemos el resumen efectuado por Edwin Antonio Reyes Aguilera, al considerarlo más completo.




Tabla 6 Resumen de las ventajas de la digestión anaerobia

| | | |
|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| VENTAJAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA |  PROCESO <ul style="list-style-type: none"> • Permite el tratamiento de fracciones orgánicas de residuos urbanos de diferentes procedencias • Elevados porcentajes de eliminación de materia volátil (40-60%) • Elevada destrucción de organismos patógenos y organismos parásitos: también produce la inactivación de algunos virus patógenos (enterovirus y parcovirus), según el tipo de virus, del proceso de depuración y de la temperatura • Baja producción y estabilización de lodos • Alto grado de estabilización del vertido trabajando con altas velocidades de carga • Disminución muy significativa de la relación de alcalinidad, así el proceso aporta alcalinidad para favorecer un proceso posterior de nitrificación, total o parcial. |  PRODUCTO FINAL <ul style="list-style-type: none"> • Baja generación total de sólidos biológicos: el producto final posee características similares al compost producido aeróbicamente. Además, el producto final es inerte y rico en ciertos nutrientes y puede emplearse en agricultura como mejorador de suelo. • Eliminación de ácidos volátiles (AGV) y otros compuestos fácilmente biodegradables, contribuyen para disminuir la fitotoxicidad del residuo final. |
| | |  ENERGÍA <ul style="list-style-type: none"> • Alta producción de biogás compuesto fundamentalmente por CH₄ y CO₂ • Obtención de biogás susceptible de aprovechamiento energético y económico. • Bajo consumo energético: la alta producción de biogás con elevado valor energético reduce significativamente los costes del tratamiento. • Reducción de la emisión de gases responsables por del efecto invernadero. |
| | | |

Fuente: elaboración propia a partir de las ventajas recogidas en (10)

Por otra parte, con respecto a las desventajas, seguidamente aparecen algunas de las más repetidas a lo largo de la bibliografía consultada:

Tabla 7 Resumen de las desventajas de la digestión anaerobia

| | | |
|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DESVENTAJAS DE LA DIGESTIÓN ANAEROBIA |  INICIO O PUESTA EN MARCHA <ul style="list-style-type: none"> • Periodo de inicio largo (30 a 180 días) como consecuencia de la baja velocidad de crecimiento de los microorganismos anaerobios, concretamente, de los microorganismos metanogénicos. • El período de tiempo necesario para la puesta a punto del sistema varía en función de la calidad y cantidad del inóculo utilizado. Si no se cuenta con inóculos adecuados, se puede prolongar, incluso, hasta condiciones críticas en las que nunca se alcanza la estabilidad. • Requiere contar con las herramientas apropiadas para la evaluación de los inóculos. • Es necesario desarrollar costosos procesos para la obtención de semillas o inóculos más eficientes. • Necesidad de nodo granular para arranques rápidos. |  PROCESO <ul style="list-style-type: none"> • Es un proceso sensible a inhibidores tales como O₂, H₂O₂, Cl₂, H₂S y HCN • Se producen otros compuestos H₂S altamente corrosivos, mercaptanos, ácidos orgánicos y aldehídos. • Baja eliminación de patógenos: los patógenos son parcialmente eliminados, a excepción de los huevos de helminto, los cuales quedan atrapados en la cama de lodos. • Producción de olores: se producen malos olores atribuidos a la producción de compuesto azufrados como el ácido sulfhídrico en el biogás. Es necesario un sistema simple de control. |
| | |  POST-TRATAMIENTO <ul style="list-style-type: none"> • No se logra la misma remoción de materia orgánica que con los procesos aerobios. Debido a ello es necesario complementar con un postratamiento para su eliminación. |
| | | |

Fuente: elaboración propia a partir de las desventajas más citadas en la bibliografía consultada.

ANEXO 3

Tabla 8 Resumen de los productos metabólicos liberados durante la fermentación de diferentes polisacáridos

| Organismo | Fuente | Sustrato | Productos* |
|-----------------------------------|------------------------|--------------|-------------------------------------------------|
| <i>Bacteroides succinogenes</i> | Rumen | Celulosa | F, A, S |
| | | Celulosa | F, L, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Bacteroides fibrisolvens</i> | Rumen | Hemicelulosa | F, B, L, H ₂ , CO ₂ |
| | | Pectina | F, A, B, L, M, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Bacteroides rumenicola</i> | Rumen | Hemicelulosa | F, A, P, S |
| | | Pectina | F, A, P, B, L, S |
| <i>Ruminococcus flavefaciens</i> | Rumen | Celulosa | F, A, S, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Neocallimastix frontalis</i> | Rumen | Celulosa | F, A, L, E, CO ₂ |
| <i>Rumen spirochetes</i> | Rumen | Pectina | F, A, L, S, M |
| <i>Rumen treponemes</i> | Rumen | Pectina | F, A, S, M |
| <i>Lachnospira multiparus</i> | Rumen | Pectina | F, A, L, M, E, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Acetivibrio cellulolyticus</i> | Digestor | Celulosa | A, E, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Clostridium thermocellum</i> | Digestor | Celulosa | A, E, H ₂ , CO ₂ |
| <i>Clostridium papyrosolvens</i> | Sedimentos de estuario | Pectina | F, A, L, E |
| <i>Clostridium butyricum</i> | Sedimentos de lago | Pectina | A, B, M, E, H ₂ , CO ₂ |

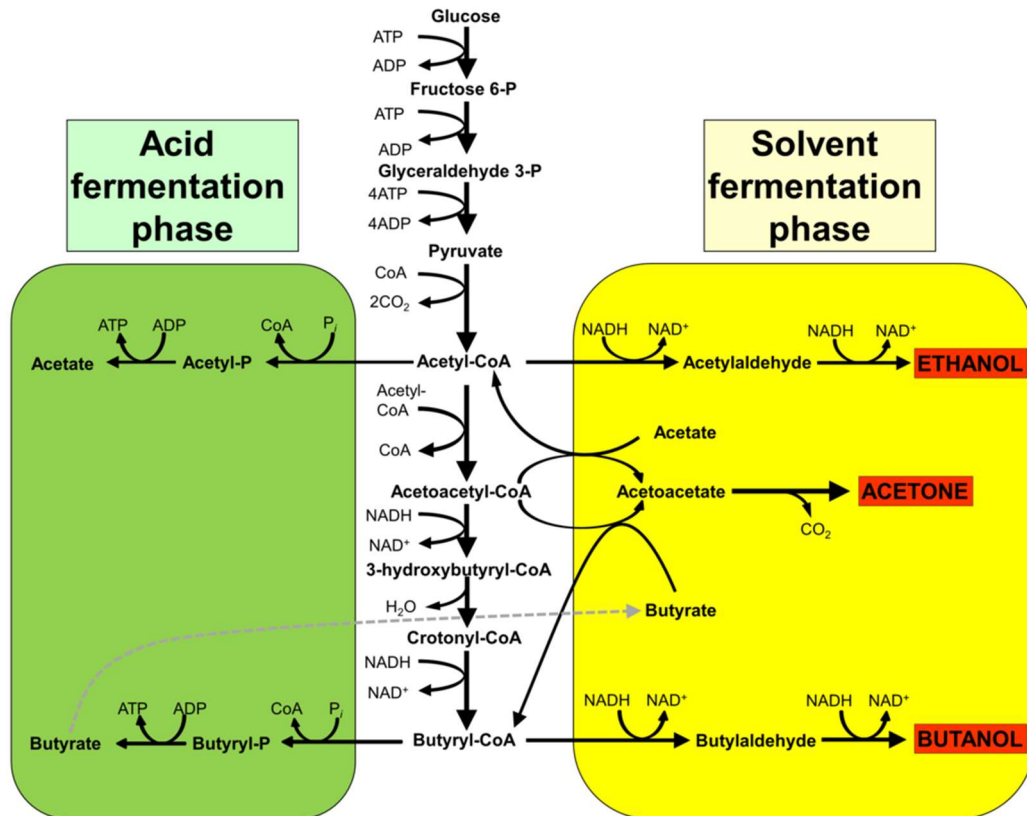
*F = formato, A = acetato, P = propionato, B = butirato, S = succinato, L = lactato, M = metanol, E = etanol.

Fuente: Almeida A, Nafarrate-Rivera E, Alvarado A, Cervantes-Ovalle A, Luevanos MPE, Oropeza R, Balagurusamy N. Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila [Internet] 2011 [consultado el 16 de octubre de 2019]; 3(6):14-34. Disponible en:

<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art%203%20Almeida%20y%20col.pdf>

ANEXO 4

Figura 4 Esquema de la Fermentación acetona–butanol–etanol o ABE (Fermentación ácido-mixta)



Fuente: Acetone–butanol–ethanol fermentation [Internet]. En.wikipedia.org. 2015 [consultado el 17 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://en.wikipedia.org/wiki/Acetone–butanol–ethanol_fermentation#/media/File:Acetone–butanol–ethanol_fermentation.png

ANEXO 5

Las concentraciones (mg/L) a partir de las cuales los cationes de metales ejercen efectos inhibitorios en el proceso anaerobio varían según la bibliografía consultada, pues encontramos diferentes concentraciones en las tablas elaboradas por Parkin y Owen, Flotats y Campos (elaborada a partir de los datos de Hayes y Theis y a Lawrence y McCarty) y el ISAT (*Information and advisory Service on Appropriate Technology*). Esto se debe a que, si la introducción del catión en el reactor se produce de forma gradual, los microorganismos pueden aclimatarse y el efecto tóxico es menor.

Tabla 9 Concentraciones (en mg/l) de compuestos inorgánicos inhibitorios del proceso anaerobio.

| SUSTANCIA /REFERENCIA | CONCENTRACIÓN MODERADAMENTE INHIBITORIA (mg/L) | | CONCENTRACIÓN LIMITE DE TOXICIDAD (mg/L) | | | CONCENTRACIÓN PARA 50% DE INHIBICIÓN (mg/L) |
|--------------------------|---------------------------------------------------|---------------|------------------------------------------|------------------|----------|------------------------------------------------|
| | Parkin | Hayes y Theis | Parkin | Hayes y Theis | ISAT | Lawrence y McCarty |
| Na ⁺ | 3500-5500 | - | 8000 | - | 8000 | - |
| K ⁺ | 2500-4500 | - | 12000 | - | - | - |
| Ca ⁺² | 2500-4500 | - | 8000 | - | 8000 | - |
| Mg ⁺² | 1000-1500 | - | 3000 | - | 3000 | - |
| Cu | 200 | 40 | 200 (total) 0,5 (soluble) | 70 | 10-250 | 211 |
| Cr (VI) | - | 110 | 50-70 (total) 3 (soluble) | 420 | 200-2000 | - |
| Cr (III) | - | 130 | 200-260 (total) | 260 | | - |
| Ni | - | 10 | 180-420 (total) 2 (soluble) | 30 | 100-1000 | 134 |
| Zn | - | 400 | 30 (total) 1 (soluble) | 600 | 350-1000 | 136 |
| Pb | - | 340 | - | > 340 | - | - |
| Cd | - | - | - | > 20 | - | - |

Fuente: adaptación de:

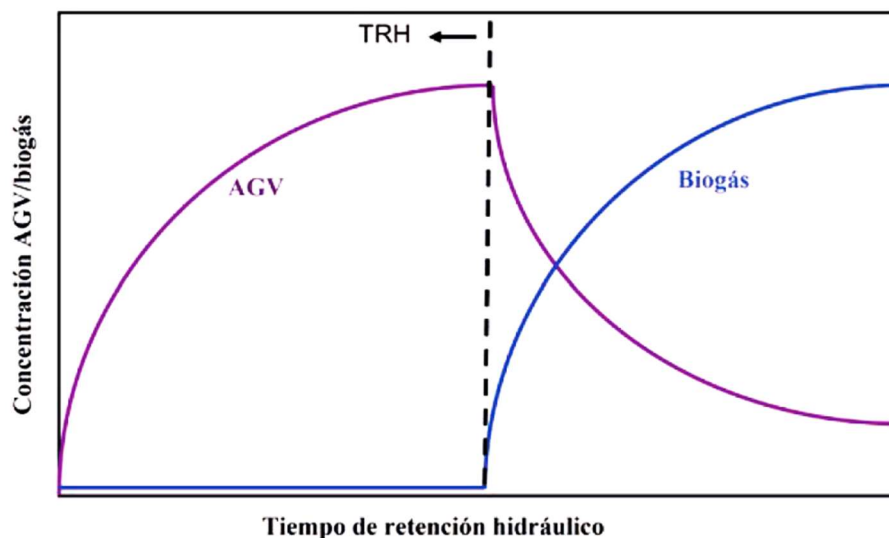
Parkin GF, Owen WF. Fundamentals of anaerobic digestion of wastewater sludges. Journal of environmental engineering; 1986 Oct, 112(5):867-920.

Campos Pozuelo E, Elías Castells X, Flotats Ripoll X. Procesos biológicos: La digestión anaerobia y el compostaje. En: Elías Castells X, editores. Tratamiento y valorización energética de residuos. Díaz de Santos y FUNIBER, 2005, p. 618-1206.

Kossman W, Pönitz U, Habermehl S, Hoerz T, Kramer P, Klingler B et al. Biogas Digest. Information and advisory service on appropriate technology (ISAT); 2004, 1

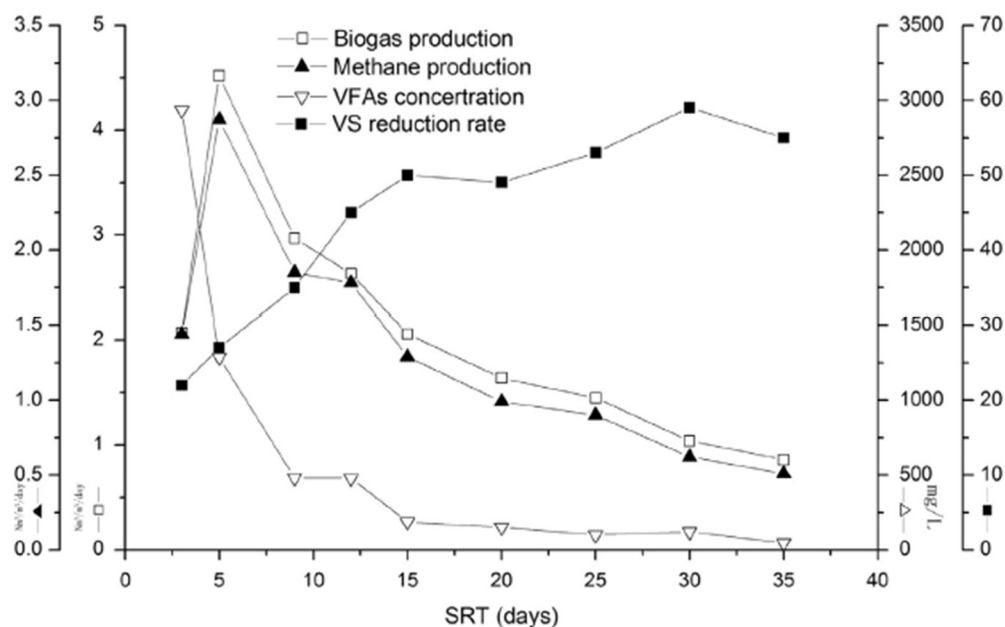
ANEXO 6

Figura 5 Gráfico de la Evolución de la producción de los AGV y el biogás en función del tiempo de retención hidráulico aplicado durante el proceso de fermentación anaerobia.



Fuente: Silvestre Tormo G. Biorefinerías a partir de lodos de EDAR. En: Chiva Vicent S, Berlanga Clavijo JG, Martínez Cuenca R, Climent Agustina J, 1.^a ed., editores. Depuración de aguas residuales: digestión anaerobia [Internet]. Castellón de la Plana, Comunidad Valenciana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I; 2018, p. 217-236 [citado 17 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.6035/UJI.FACSA.2018.2>

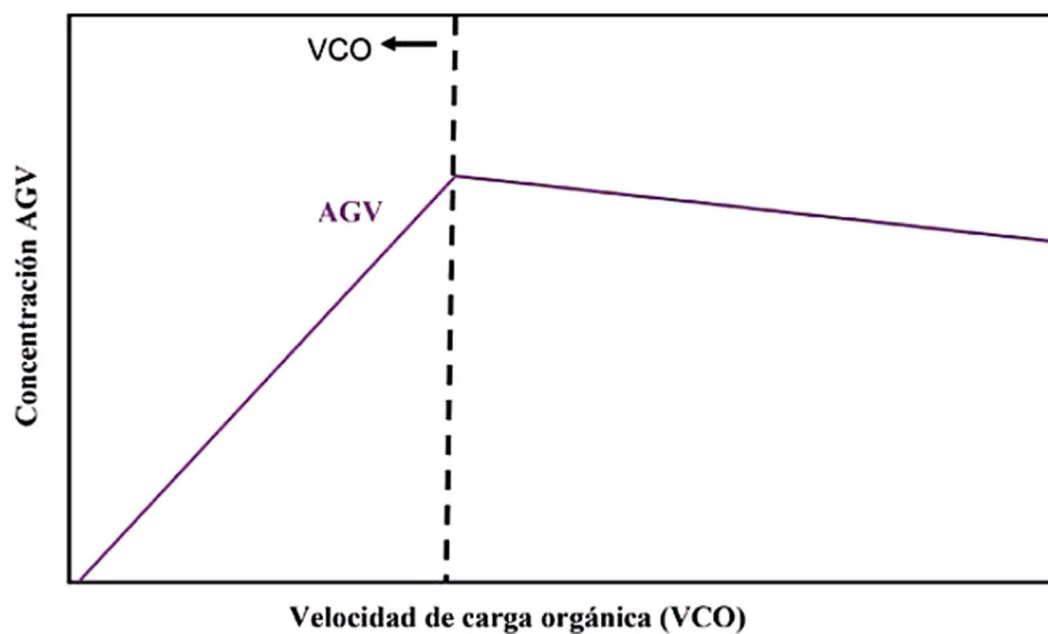
Figura 6 Gráfico del efecto del tiempo de retención de sólidos en el progreso de la estabilidad de la digestión anaerobia



Fuente: Nges IA, Liu J. Effects of solid retention time on anaerobic digestion of dewatered-sewage sludge in mesophilic and thermophilic conditions. Renewable Energy [Internet]; 2010 Oct 1, [Consultado el 17 de noviembre de 2019], 35(10):2200–2206. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2010.02.022>

ANEXO 7

Figura 7 Evolución de la producción de los AGV en función de la velocidad de carga orgánica (VCO) aplicada en un proceso de fermentación anaerobia



Fuente: Silvestre Tormo G. Biorefinerías a partir de lodos de EDAR. En: Chiva Vicent S, Berlanga Clavijo JG, Martínez Cuenca R, Climent Agustina J, 1.a ed., editores. Depuración de aguas residuales: digestión anaerobia [Internet]. Castellón de la Plana, Comunidad Valenciana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I; 2018, p. 217-236 [citado 17 de noviembre de 2019]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.6035/UJI.FACSA.2018.2>

ANEXO 8

Si tenemos en cuenta que la relación C:N óptima es 30:1 (tal y como hemos indicado previamente en este TFG), pudiendo ser, incluso, 20:1 (según Khalid et al. (147)) o 15:1 (según Speece (148)), los sustratos que presentan una relación C/N más adecuada, en general, son los residuos animales, como podemos ver en la Tabla 10:

Tabla 10 Tablas de relaciones C/N más habituales en función del sustrato.

| Materiales | % C | % N | C/N |
|---------------------------|------------|------------|------------|
| Residuos animales | | | |
| Bovinos | 30 | 1.30 | 25:1 |
| Equinos | 40 | 0.80 | 50:1 |
| Ovinos | 35 | 1.00 | 35:1 |
| Porcinos | 25 | 1.50 | 16:1 |
| Caprinos | 40 | 1.00 | 40:1 |
| Conejos | 35 | 1.50 | 23:1 |
| Gallinas | 35 | 1.50 | 23:1 |
| Patos | 38 | 0.80 | 47:1 |
| pavos | 35 | 0.70 | 50:1 |
| Excretas humanas | 2.5 | 0.85 | 3:1 |
| Residuos vegetales | | | |
| Paja trigo | 46 | 0.53 | 87:1 |
| Paja cebada | 58 | 0.64 | 90:1 |
| Paja arroz | 42 | 0.63 | 67:1 |
| Paja avena | 29 | 0.53 | 55:1 |
| Rastrojos maíz | 40 | 0.75 | 53:1 |
| Leguminosas | 38 | 1.50 | 28:1 |
| Hortalizas | 30 | 1.80 | 17:1 |
| Tubérculos | 30 | 1.50 | 20:1 |
| Hojas secas | 41 | 1.00 | 41:1 |
| Aserrín | 44 | 0.06 | 730:1 |

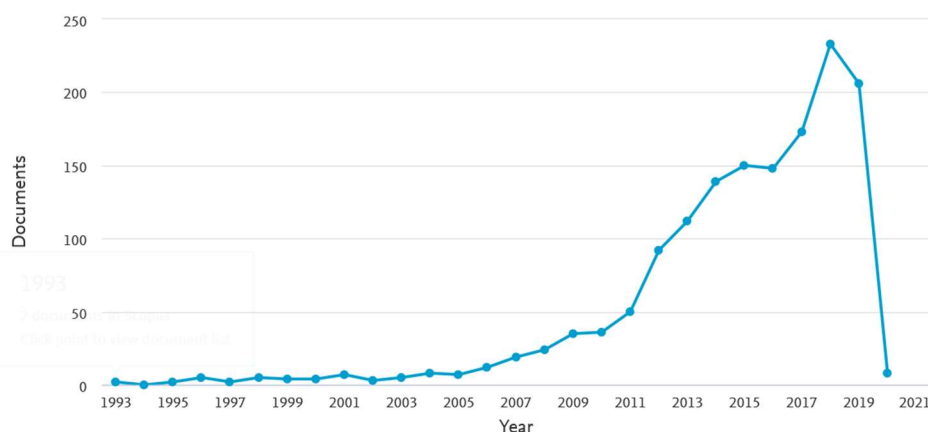
Fuente: Varnero y Arellano, 1991. Visto en Varnero Moreno M. Manual de Biogás. Santiago de Chile: FAO; 2011.

*Por otro lado, la relación C/N para la pulpa de café (que no figura en el cuadro anterior) es de 57,2 (visto en (113))

ANEXO 9

Con el fin de comprobar cuán extendida está la investigación e, incluso, la aplicación de la codigestión anaerobia, recurrimos a la base de datos Scopus con la finalidad de encontrar el número total de artículos que contuvieran el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título (954 artículos) o en alguna parte del título, del resumen o en la lista de palabras clave (1.491 artículos). De este modo, centrándonos en este último grupo de artículos y analizando las fechas de publicación, nos percatamos de que, en realidad, la codigestión anaerobia no es un concepto tan nuevo, ya que el primer artículo donde se habla de dicho término data de 1993.

Figura 8 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave



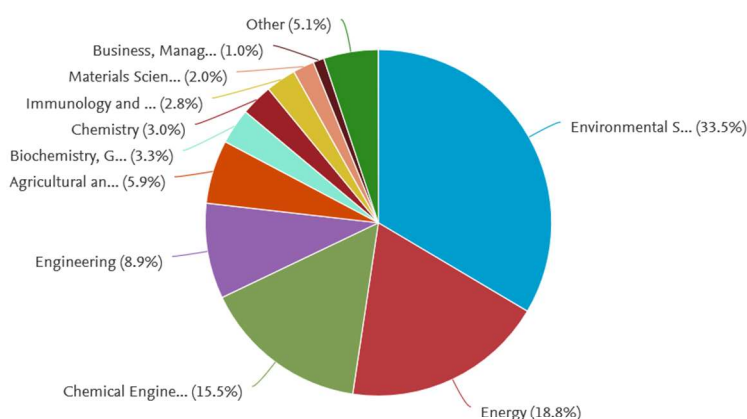
Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

Además, como podemos observar, aunque su estudio comenzó a incrementarse a partir del 2004, fue, en realidad, a partir del 2010 cuando realmente se comenzó a prestar más atención a la codigestión anaerobia como una buena estrategia para el aumento del rendimiento de la producción de biogás. De hecho, este año 2019 junto con el año 2018, son los años en los cuales se ha publicado un mayor número de artículos referentes a este tema (206 y 233 artículos respectivamente)

Por otro lado, si nos centramos en el área temática de estos artículos vemos como la mayor parte de ellos están centrados en la producción de energía y en el medio ambiente, ya que, de hecho, la codigestión anaerobia resulta de gran interés debido a que favorece la degradación y eliminación de desechos o residuos difíciles de eliminar a causa de la adición simultánea de dos sustratos diferentes al reactor, los cuales se complementan.

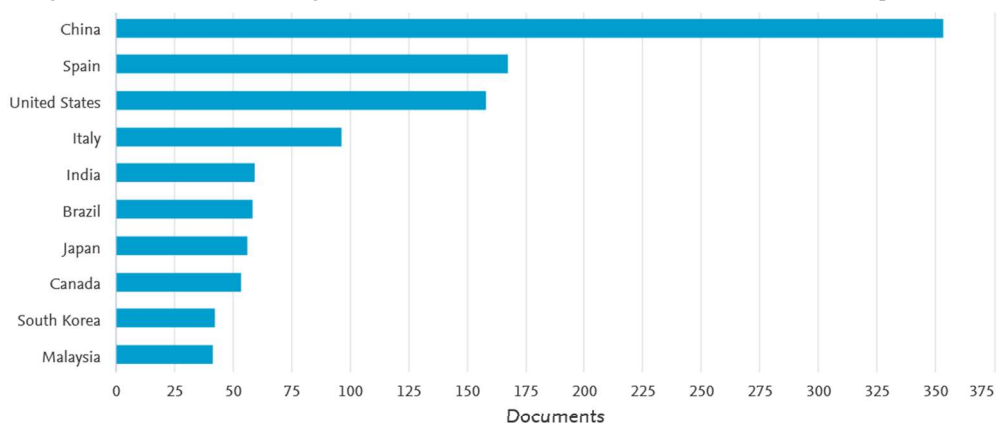
Finalmente, en cuanto a los países con mayor número de publicaciones sobre codigestión anaerobia, China va en cabeza, seguido por España y EE. UU. A nuestro parecer, esto es interesante, pues en España, tanto la agricultura como la ganadería constituyen una parte importante de nuestra economía, la cual se puede rentabilizar todavía más aprovechando los residuos derivados de estas actividades para la producción de biogás. Esto resultaría positivo tanto para el medio ambiente como para la economía del país.

Figura 9 Gráfico de las áreas temáticas tratadas en el número total de artículos publicados que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave



Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

Figura 10 Gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “codigestión anaerobia” o “co-digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave

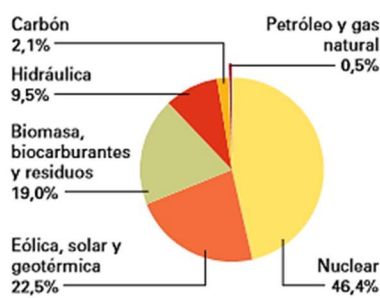


Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

Además, si tenemos en cuenta el hecho de que, en España, en 2016, el 19,0% de la producción interior de energía primaria procedía de la biomasa, biocarburantes y residuos y que, esta energía, junto con la energía hidráulica, eólica, solar y geotérmica constituyen el 51% de la producción interior de energía primaria, esto nos lleva a pensar que España está apostando por la producción de energías renovables. Por tanto, mejorar la producción de biogás mediante el uso de la codigestión anaerobia permitiría a España reducir su dependencia energética.

Figura 11 Producción y consumo de energía primaria en España en el año 2016

Producción interior de energía primaria. 2016



Fuente: Mº de Energía, Turismo y Agenda Digital

Consumo de energía primaria. 2016

| | Consumo | | |
|-----------------------------------------------|----------------|--------------|------------------------|
| | ktep* | % | Variación interanual % |
| Total | 123.484 | 100,0 | 0,2 |
| Petróleo | 54.633 | 44,2 | 2,7 |
| Gas natural | 25.035 | 20,3 | 2,0 |
| Nuclear | 15.260 | 12,4 | 2,2 |
| Carbón | 10.442 | 8,5 | -23,7 |
| Eólica, solar y geotérmica | 7.394 | 6,0 | -1,1 |
| Biomasa, biocarburantes y residuos renovables | 6.688 | 5,4 | -1,5 |
| Hidráulica | 3.130 | 2,5 | 30,6 |
| Residuos no renovables | 243 | 0,2 | -3,7 |
| Saldo imp-exp electricidad | 659 | | |

*ktep: miles de toneladas equivalentes de petróleo

Fuente: Ministerio de Energía, Turismo y Agenda Digital

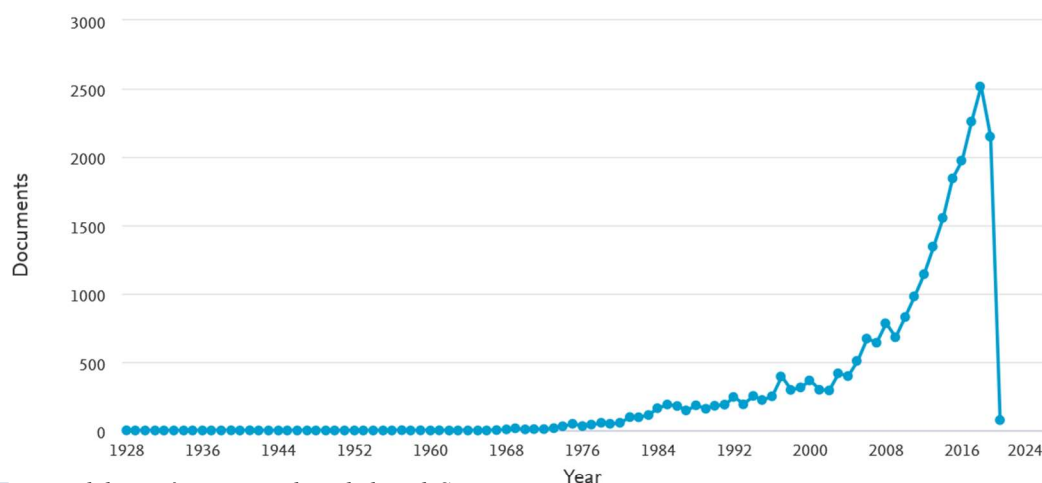
Fuente: Ministerio de Energía, Turismo y Agenda Digital. Visto en España en cifras 2018 [Internet]. Ine.es. 2019 [consultado el 18 de noviembre de 2019]. Disponible en: https://www.ine.es/prodyser/espa_cifras/2018/40/#zoom=z

Finalmente, también debemos insistir en que; si bien la mayor parte de estos artículos está centrada en el uso de la co-digestión anaerobia para la producción de biogás o biometano (1.004 de los 1.491 artículos), consideramos interesante resaltar que 26 de los 1.491 artículos están relacionados con la producción de biohidrógeno, pues se trata de un combustible limpio que se puede producir a partir de ciertos tipos de biomasa.

No obstante, pese a que parece que el estudio de la codigestión anaerobia sigue aumentando, el número de artículos publicados es bastante reducido, si lo comparamos con el número de artículos publicados que contienen el término “digestión anaerobia” sólo en el título (6.913 artículos) o en alguna parte del título, resumen o lista de palabras clave (26.057 artículos, de los cuales 10.816 están relacionados con la producción de biogás o de biometano). Además, si comparamos los años de publicación, vemos que la digestión anaerobia como tal (año 1928), así como su aplicación para la producción de biogás (año 1973) comenzaron a estudiarse muchos años antes que la codigestión anaerobia. De hecho, podemos encontrar incluso artículos que se van a publicar en 2020 (76 artículos relacionados con la digestión

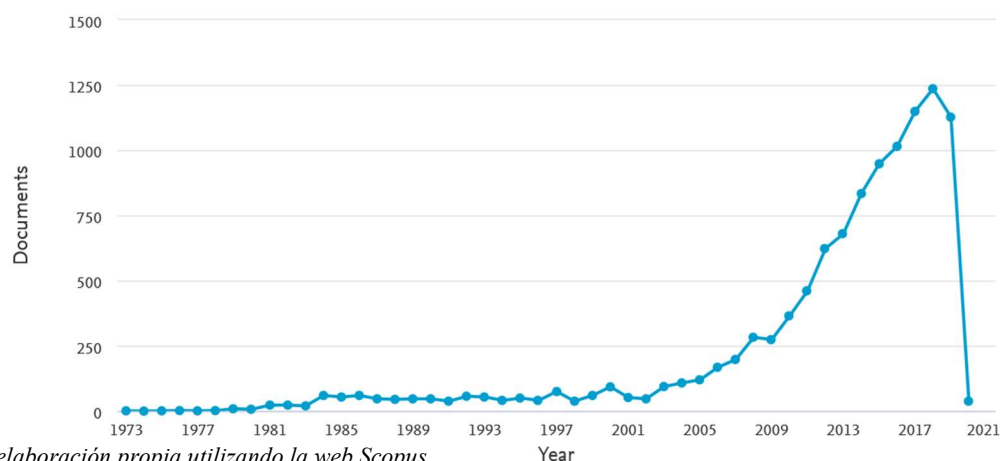
anaerobia como tal y 38 artículos relacionados con su aplicación para la producción de biogás o biometano).

Figura 12 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave.



Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

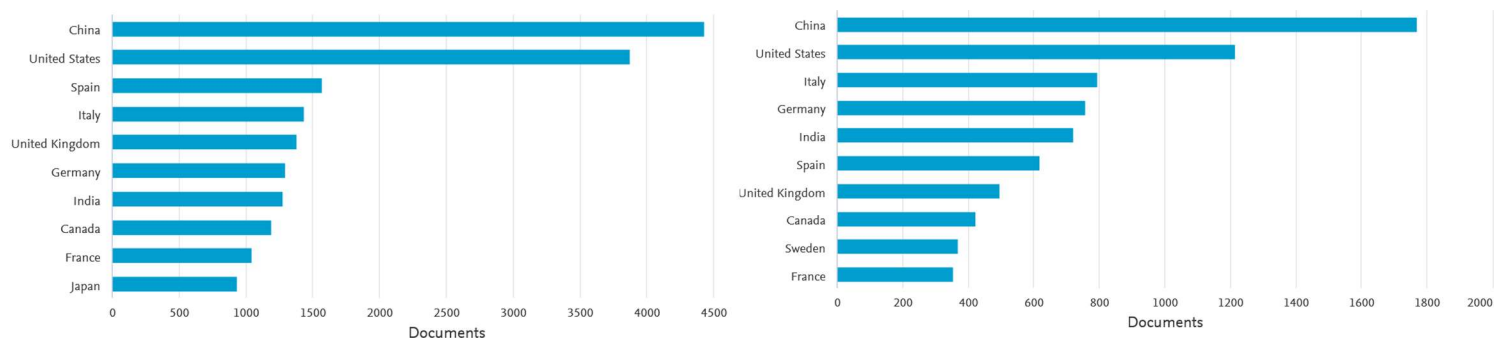
Figura 13 Número total de artículos publicados en cada año que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave y que, además, están relacionados con la producción de biogás o de biometano



Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

No obstante, si nos fijamos en qué países publican más, vemos que en cabeza está China, seguida de EE. UU. Por otro lado, España queda en tercera posición con respecto a la publicación de artículos relacionados con el concepto de digestión anaerobia en general; mientras que, en lo referente a la publicación de artículos relacionados con la aplicación de la digestión anaerobia para la producción de biogás o biometano, queda en sexta posición.

Figura 14 Gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave (izquierda) y gráfico de los países con mayor número de artículos publicados que contienen el término “digestión anaerobia” en el título, del resumen o en la lista de palabras clave que, además, tratan sobre la producción de biogás y/o biometano (derecha)



Fuente: elaboración propia utilizando la web Scopus

Por tanto, la conclusión que podemos extraer de estos datos es que; si bien la codigestión anaerobia es una técnica muy prometedora con una gran cantidad de ventajas (tal y como hemos visto previamente en este TFG), por el momento, todavía queda mucho por investigar. Además, dado que la digestión anaerobia ha sido estudiada desde hace mucho más tiempo, es mejor conocida y está mucho más instaurada, lo cual reduce el interés del estudio de la codigestión anaerobia. No obstante, consideramos que sería necesario favorecer dicha investigación, ya que la codigestión anaerobia es capaz de hacer frente a muchas limitaciones de la digestión anaerobia.

ANEXO 10

A la hora de realizar la digestión anaerobia, se pueden utilizar una gran diversidad de materias primas (residuos animales, agroindustriales, forestales, domésticos, etc.), siendo algunas más adecuadas que otras en función del tipo, concentración y proporción de los nutrientes que presentan; así como otros aspectos (como el pH, biodegradabilidad, etc.).

De hecho, la relación C/N del sustrato resulta de gran ayuda a la hora de determinar si el proceso está funcionando adecuadamente y, por tanto, estimar si la producción de biogás va a ser buena o no.

Tabla 11 Producción de biogás a partir de residuos animales.

| Estiércol | Disponibilidad Kg/día* | Relación C/N | Volumen de biogás | |
|------------------|---------------------------|-----------------|-------------------|------------|
| | | | m³/kg húmedo | m³/día/año |
| Bovino (500 kg) | 10.00 | 25:1 | 0.04 | 0.400 |
| Porcino (50 kg) | 2.25 | 13:1 | 0.06 | 0.135 |
| Aves (2 kg) | 0.18 | 19:1 | 0.08 | 0.014 |
| Ovino (32 kg) | 1.50 | 35:1 | 0.05 | 0.075 |
| Caprino (50 kg) | 2.00 | 40:1 | 0.05 | 0.100 |
| Equino (450 kg) | 10.00 | 50:1 | 0.04 | 0.400 |
| Conejo (3 kg) | 0.35 | 13:1 | 0.06 | 0.021 |
| Excretas humanas | 0.40 | 3:1 | 0.06 | 0.025 |

**El dato se refiere a la cantidad estimada de estiércol que es posible recolectar de todo el producto*

Fuente: Varnero y Arellano, 1991. Visto en Varnero Moreno M. Manual de Biogás. Santiago de Chile: FAO; 2011.

Tabla 12 Producción de biogás a partir de residuos vegetales.

| Residuos | Cantidad residuo Ton/ha | Relación C/N | Volumen de biogás | |
|---------------------------|----------------------------|-----------------|-------------------|-------|
| | | | m³/Ton | m³/ha |
| Cereales (paja) | | | | |
| Trigo | 3.3 | 123:1 | 367 | 1200 |
| Maíz | 6.4 | 45:1 | 514 | 3300 |
| Cebada | 3.6 | 95:1 | 388 | 1400 |
| Arroz | 4.0 | 58:1 | 352 | 1400 |
| Tubérculo (hojas) | | | | |
| Papas | 10.0 | 20:1 | 606 | 6000 |
| Betarragas | 12.0 | 23:1 | 501 | 6000 |
| Leguminosas (paja) | | | | |
| Porotos | 3.2 | 38:1 | 518 | 1650 |
| Habas | 4.0 | 29:1 | 608 | 1400 |
| Hortalizas (hojas) | | | | |
| Tomate | 5.5 | 12:1 | 603 | 3300 |
| Cebolla | 7.0 | 15:1 | 514 | 3600 |

Fuente: Varnero y Arellano, 1991. Visto en Varnero Moreno M. Manual de Biogás. Santiago de Chile: FAO; 2011

De este modo, como podemos observar, los estiércoles y lodos cloacales suelen presentar C/N bajas como resultado de su alto contenido en amoníaco, lo cual acaba provocando la inhibición de la digestión anaerobia y, por tanto, la producción de biogás. No obstante, aunque este tipo de residuos suele dar bajos rendimientos, en Scopus se observa que la mayor parte de los artículos referentes a la digestión anaerobia hablan sobre el uso de este tipo de sustratos, lo cual consideramos que se debe al intento de rentabilizar los residuos ganaderos mediante la producción de biogás (pues supondría una fuente de ingresos adicional para ellos); así como una forma de reducir la contaminación generada por los mismos.

Pese a ello, para poder conseguir un buen rendimiento del proceso es necesario ajustar la relación C/N. De este modo, durante los últimos años (especialmente desde los años 2004 a 2019) se ha visto que la combinación de los residuos ganaderos con residuos agroindustriales mejora la productividad del proceso. La causa de ello es que los residuos ganaderos suelen presentar un elevado contenido en agua, así como una alta capacidad tampón y una gran variedad de nutrientes (154) (características de las cuales suelen carecer los residuos agroindustriales); mientras que los residuos agroindustriales presentan una elevada relación C/N, por lo que, como resultado, las características de un sustrato compensan las del otro favoreciendo el proceso y aumentando la producción de biogás.

A causa de dichas observaciones, el estudio de la codigestión ha comenzado a suscitar un mayor interés, siendo los residuos ganaderos el sustrato principal más utilizado. Por otro lado, como cosustratos se suelen utilizar sustratos relativamente fáciles de degradar; si bien, lo que más interés tiene actualmente es el desarrollo de técnicas que permitan utilizar sustratos difíciles de degradar (compuestos lignocelulósicos)

BIBLIOGRAFÍA

1. Mata-Alvarez J. Fundamentals of the anaerobic digestion process en Biomethanization of the organic fraction of municipal solid wastes. IWA publishing; 2002, 1-20
2. Al Seadi T, Rutz D, Prassl H, Köttner M, Finsterwalder T, Volk S, et al. Biogas handbook. Esbjerg: University of Southern Denmark Esbjerg; 2008.
3. Ming H, Hyun J, Hyub J, Moon J. Bacterial and methanogenic archaeal communities during the single-stage anaerobic digestion of high-strength food wastewater. *Bioresource Technology*; 2014, 165:174-182.
4. Molino A, Nanna F, Ding Y, Bikson B, Braccio G. Biomethane production by anaerobic digestion of organic waste. *Fuel*; 2013, 103:1003-1009.
5. Cazier E, Trably E, Steyer J, Escudie R. Biomass hydrolysis inhibition at high hydrogen partial pressure in solid-state anaerobic digestion. *Bioresource Technology*; 2015, 190:106-113.
6. Fierro J. Co-digestión de purines, residuos urbanos y de la industria del biodiesel. [Tesis doctoral]. [León, España]: Universidad de León; 2014.
7. Cuetos MJ. Digestión y co-digestión anaerobia de residuos de matadero avícola: control del proceso y evaluación del grado de estabilización. [Tesis doctoral]. [León, España]: Universidad de León; 2007.
8. Hernández MS, Delgadillo LR. Aplicación del modelo ADM1 en la digestión anaerobia de aguas residuales y desechos sólidos. *Tumbaga*; 2011, 1(6):29-42.
9. Batstone DJ, Keller J, Angelidaki I, Kalyuzhnyi SV, Pavlostathis SG, Rozzi A, et al. Anaerobic Digestion Model N° 1 (ADM1). *Water Sci. Technol.* [Internet]; 2002, [consultado el 25 de septiembre de 2019], 45(10):65-73. Disponible en: <https://doi.org/10.2166/wst.2002.0292>
10. Reyes Aguilera EA. Generación de biogás mediante el proceso de digestión anaerobia, a partir del aprovechamiento de sustratos orgánicos. *Revista Científica de FAREM-Esteli*; 2018, (24):60-81.
11. Lugón B. Análisis de biodigestores en funcionamiento. [Habana, Cuba]; 2001
12. Malina J, Pohland F. Design of anaerobic processes for the treatment of industrial and municipal wastes. *Water quality management library*; 1992, 7:169
13. Cabrera G, Gómez JM, Cantero D. Influence of heavy metals over growth and ferrous sulphate oxidation by acidithiobacillus ferrooxidans in pure and mixed cultures. *Process Biochemistry*; 2005, 40(8):2683-2687.
14. Biometano [Internet]. En AEBIG.org. 2014 [citado el 25 de septiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.aebig.org/biometano/>
15. Díaz-Báez MC, Espitia Vargas SE, Molina Pérez F. Digestión Anaerobia: una aproximación tecnológica. Universidad Nacional de Colombia; 2002, 100 p.
16. Finstein MS, Cirello J, Suler DJ, Morris ML, Strom PF, Suler J. Microbial responsible digestion ecosystems for anaerobic. *Water*; 2010, 52(11):2675-2685
17. Rodríguez Cavallini E, Gamboa Coronado M, Hernández Chavarría F, García Hidalgo JD. *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
18. Nayono SE. Anaerobic digestion of organic solid waste for energy production. KIT Scientific Publishing; 2010.
19. Gavala HN, Yenal U, Skiadas IV, Westermann P, Ahring BK. Mesophilic and thermophilic anaerobic digestion of primary and secondary sludge. Effect of pre-treatment at elevated temperature. *Water Research*; 2003, 37(19):4561-4572.
20. Almeida A, Nafarrate-Rivera E, Alvarado A, Cervantes-Ovalle A, Luevanos MPE, Oropeza R, Balagurusamy N. Expresión genética en la digestión anaerobia: un paso adelante en la comprensión de las interacciones tróficas de esta biotecnología. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* [Internet] 2011 [consultado el 16 de septiembre de 2019]; 3(6):14-34. Disponible en:

<http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/Documentos/AQM/AQM6/Art%203%20Almeida%20y%20col.pdf>

21. McCarty PL, Mosey FE. Modelling of Anaerobic Digestion Processes (A Discussion of Concepts). Water Science and Technology; 1991, 24(8):17-33.
22. Pavlostathis SG, Giraldo-Gomez E. Kinetics of Anaerobic Treatment. Water Science and Technology; 1991, 24(8):35-59.
23. Speece RE. Biotechnology for anaerobic waste treatment. Science and Technology [Internet]; 1983 Sep 1, [consultado el 20 de septiembre de 2019], 17(9):416A - 427A. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es00115a725>
24. Arango Bedoya O, Sanchez Sousa L. Tratamiento de aguas residuales de la industria láctea en sistemas anaerobios tipo UASB. Revista biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial; 2009, 7(2):24-31
25. Constanza Corrales L, Antolínez Romero D, Bohórquez Macías JA, Corredor Vargas AM. Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Nova; 2015, 13(24):55-82.
26. Hutkins RW. Microbiology and Technology of Fermented Foods. Primera edición. Blackwell Publishing; 2006.
27. Van der Meulen R, Avonts L, De Vuyst L. Short Fractions of Oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-173 010. Appl Environ Microbiol [Internet] 2004 [consultado 15 de Octubre de 2019], 70(4):1923-1930. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC383053/>
28. Jaramillo Obando JJ, Cardona CA. Análisis de la producción de biobutanol en la fermentación acetobutílica con *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 ATCC13564. Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia [Internet] 2011 [acceso 30 Septiembre 2019] (58):36-45. Disponible en: <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/ingenieria/article/view/14597/12761>
29. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Brock's Biology of Microorganisms. Pearson 12th edition; 2006. 1296 p.
30. Vincent MC, Álvarez S, Zaragoza JL. Química industrial orgánica. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia; 2006.
31. Parés I Farràs R, Juárez Gimenez A. Bioquímica de los microorganismos. Barcelona, España: Reverté S.A; 1997, 404 p.
32. Hsu ST, Yang ST. Propionic acid fermentation of lactose by *Propionibacterium acidipropionici*: effects of pH. Biotechnol Bioeng. [Internet] 1991 Sep [consultado 30 de septiembre de 2019]; 38(6):571-578. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604876>
33. Wang Z, Yang ST. Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *Shermanii*. Bioresource Technology [Internet] 2013 Jun [consultado el 30 de septiembre de 2019]; 137:116-123. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23584412>
34. Allison C, Macfarlane GT. Dissimilatory nitrate reduction by *Propionibacterium acnes*. Appl. Environ. Microbiol. [Internet] 1989 Nov [consultado el 23 de septiembre de 2019]; 55(11):2899-2903. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC203188/?page=1>
35. Varnero Moreno M. Manual de Biogás. Santiago de Chile: FAO; 2011.
36. Mara D, Horan, NJ. The handbook of water and wastewater microbiology. Academy Press; 2003, 823 p.
37. Drake HL, Küsel K, Matthies, C. Ecological consequences of the phylogenetic and physiological diversities of acetogens. Antonie Van Leeuwenhoek. [Internet]. 2002. [Consultado 29 de septiembre de 2019]; 81(1):203-213. Disponible en: <https://doi.org/10.1023/A:1020514617738>
38. Müller V. Energy Conservation in Acetogenic Bacteria. Appl. Environ. Microbiol.; 2003, 69(11):6345-6353.

39. Schink B. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*; 1997, 61(2):262-280.
40. Demirel B, Scherer P. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2008;7(2):173-190
41. Chynoweth DP, Isaacson R. *Anaerobic Digestion of Biomass*. [Internet] Nueva York, EE.UU.: Elsevier Applied Science; 1987 [consultado 8 de octubre de 2019] Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144456587900138?via%3Dihub>
42. Whitman WB, Bowen U, Boone DR. The Methanogenic Bacteria. En: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer K-H, 2ª, editores. *The Prokaryotes*. Nueva York, EE.UU.: Springer Verlag; 1992. p.719-767.
43. Grotenhuis JT, Smith M, Plugge CM., Xu YS, Van Lammeren AA, Stams AJ, Zehnder AJ. Bacteriological composition and structure of granular sludge adapted to different substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*; 1991 Jul 1, 57(7):1942-1949.
44. Stafford DA. The effects of mixing and volatile fatty acid concentrations on anaerobic digester performance. *Biomass* [Internet]. 1982 [consultado el 8 de Octubre de 2019]; 2(1):43-55. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0144456582900063>
45. Zeikus JG. Thermophilic bacteria: Ecology, physiology and technology. *Enzyme Microb Technol.*; 1979 Oct 1;1(4):243-252.
46. Safferman SI, Kirk DM, Faivor LL, Haan WW. *Anaerobic Digestion Processes*. En: Mohee R, Mudhoo A., editores. *Bioremediation and Sustainability: research and applications*. John Wiley & Sons; 2012. p.103-136.
47. Digestión Anaerobia. [Internet] Murcia, España: AgroWaste; 2013 [consultado el 16 de octubre de 2019] Disponible en: <http://www.agrowaste.eu/wp-content/uploads/2013/02/DIGESTION-ANAEROBIA.pdf>
48. Lacueva Ratera, L. Estudio de Alternativas y Dimensionamiento de Biodigestores para Aplicaciones Domésticas en la zona rural de Nwadjahane en Mozambique. [Internet] [Trabajo Fin de Grado] [España y Mozambique]: Universidad de Eduardo Mondlane de Mozambique y la Universitat Politècnica de Catalunya; 2011 [Consultado el 16 de octubre de 2019] Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/14508>
49. Parra Orobio BA, Torres Lozada P, Marmolejo Rebellón LF, Cárdenas Cleves LM, Vásquez Franco C, Torres López WA, Ordoñez Andrade JA. Influencia del pH sobre la digestión anaerobia de biorresiduos de origen municipal. *Revista UDCA*; 2014, 17(2):553-562
50. Zeeman G, Wiegant WM, Koster-Treffers ME, Lettinga G. The influence of the total-ammonia concentration on the thermophilic digestion of cow manure. *Agricultural Wastes*; 1985, 14(1):19-35.
51. Jankowska E, Chwiałkowska J, Stodolny M, Oleskiewicz-Popiel P. Effect of pH and retention time on volatile fatty acids production during mixed culture fermentation. *Bioresource Technology*. 2015, 190:274-280.
52. Chen Y, Cheng JJ, Creamer KS. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*; 2008, 99(10):4044-4064.
53. Hansen KH, Angelidaki I, Ahring BK. Anaerobic digestion of swine manure: inhibition by ammonia. *Water Research*; 1998, 32(1):5-12.
54. Hashimoto A. Ammonia inhibition of methanogenesis from cattle wastes. *Agricultural Wastes*; 1986, 17(4):241-261.
55. Kondusamy D, Kalamdhad AS. Pre-treatment and anaerobic digestion of food waste for high rate methane production – A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*; 2014, 2(3):1821-1830.

56. Jantsch TG, Mattiasson B. An automated spectrophotometric system for monitoring buffer capacity in anaerobic digestion processes. *Water Res.* 2004 Oct 1;38(17):3645-3650.
57. Esteban Gutierrez M. Co-digestion anaerobia de lodo de EDAR con residuos orgánicos de diferente naturaleza: combinación de técnicas experimentales y herramientas matemáticas [Internet] [Tesis Doctoral]. [Navarra, España]: Universidad de Navarra. 2014. [consultado el 17 de octubre de 2019] Disponible en: <http://hdl.handle.net/10171/35814>
58. Cajigas Cerón AA, Perez Vidal A, Torres Lozada P. Importancia del pH y la alcalinidad en el tratamiento anaerobio de las aguas residuales del proceso de extracción de almidón de yuca. *Scientia et Technica* [Internet]. 2005 [consultado el 18 de octubre de 2019]; 11(27):243-248. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84911698045>
59. Kim M, Ahn YH, Speece RE. Comparative process stability and efficiency of anaerobic digestion; mesophilic vs. thermophilic. *Water Res.* 2002; 36(17):4369-4385.
60. Yenigün O, Demirel B. Ammonia inhibition in anaerobic digestion: A review. *Process Biochemistry.* 2013 May 1; 48(5-6):901-911.
61. Bote Tello PA. Estudio de los efectos del pH extremo por adición de NaOH sobre la producción y calidad del biogás y otros parámetros de la digestión anaerobia urbana [Trabajo Fin de Máster]. [Alicante, España]: Instituto Universitario del Agua y de las Ciencias Ambientales. [Internet]; 2013. [consultado el 18 de octubre de 2019] Disponible en: <https://iuaca.ua.es/en/master-agua/documentos/-gestadm/end-of-master-work/tfm-2013-pedro-boat.pdf>
62. Moraes BS, Zaiat M, Bonomi A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*; 2015 Abr 1, 44:888–903.
63. Björnsson L, Murto M, Mattiasson B. Evaluation of parameters for monitoring an anaerobic co-digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 2000 Dic 1; 54(6):844-849.
64. Korres NE, O’Kiely P, Benzie JAH, West JS. *Bioenergy Production by Anaerobic Digestion: Using agricultural biomass and organic wastes*. Abingdon: Routledge; 2013. 472 p.
65. Flotats Ripoll X, Sarquella Planella L. Producció de biogás per codigestió anaeròbia. [Internet] Cataluña, España: ICAEN; 2008 Jul. [Consultado el 19 de octubre de 2019] Disponible en: https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/101069/2008_biogas.pdf
66. Núñez Pintado LF. Modelamiento y control de proceso de digestión anaerobia para la producción de biogás a partir de residuos orgánicos y/o aguas residuales [Internet] [Trabajo Fin de Máster]. [Piura, Perú]: Universidad de Piura; 2017. [Consultado el 19 de octubre de 2019] Disponible en: <https://pirhua.udep.edu.pe/handle/11042/2986>
67. Drosch B. Process monitoring in biogas plants. [Internet] París, Francia: IEA Bioenergy; 2013. [Consultado el 20 de octubre de 2019] Disponible en: https://www.nachhaltigwirtschaften.at/resources/iea_pdf/reports/iea_bioenergy_task37_brochure_biogas_process_monitoring.pdf
68. Torres P, Cardoso A, Rojas O. Mejoramiento de la Calidad de Lodos Anaerobios. Influencia de la Adición de Cloruro Férrico. *Ing Compet*; 2011 Jun 4, 5(2):23-31.
69. Campos Pozuelo AE. Optimización de la digestión anaerobia de purines de cerdo mediante codigestión con residuos orgánicos de la industria agroalimentaria [Internet] [Tesis Doctoral]. [Lleida, España]: Universitat de Lleida; 2001 Jul 27 [Consultado el 20 de octubre de 2019] Disponible en: <http://hdl.handle.net/10459.1/63733>
70. Speece RE. Nutrient Requirements. En: Isaacson R, Chynoweth DP, editores. *Anaerobic Digestion of biomass*. Elsevier applied science; 1987.
71. Kossman W, Pönitz U, Habermehl S, Hoerz T, Kramer P, Klingler B et al. *Biogas Digest. Information and advisory service on appropriate technology (ISAT)*; 2004, 1.
72. Henze M, Harremoës P, Jansen JC, Arvin E. *Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes*. Springer; 2010. 432 p.

73. Campos Pozuelo E, Elías Castells X, Flotats Ripoll X. Procesos biológicos: La digestión anaerobia y el compostaje. En: Elías Castells X, editores. Tratamiento y valorización energética de residuos. Díaz de Santos y FUNIBER, 2005, p. 618-1206.
74. Ortega NM. Phosphorus Precipitation in Anaerobic Digestion Process [Internet]. Boca Raton, Florida, EEUU: Universal Publishers; 2006. [consultado el 20 de octubre de 2019] Disponible en: <http://www.bookpump.com/dps/pdf-b/1123329b.pdf>
75. Lorenzo Acosta Y, Obaya Abreu MC. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA [Internet]; 2005 [consultado el 20 de octubre de 2019], 39(1):35-48 Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223120659006.pdf>
76. Weiland P. Biogas production: current state and perspectives. Appl Microbiol Biotechnol; 2010, 85(4):849–860.
77. Speece RE. Anaerobic biotechnology for industrial waste-waters. Nashville, Tennessee, EEUU: Archae Press; 1996.
78. Van Haandel AC, Lettinga G. Anaerobic sewage treatment: a practical guide for regions with a hot climate. John Wiley & Sons; 1994.
79. Ahring BK, Sandberg M, Angelidaki I. Volatile fatty acids as indicators of process imbalance in anaerobic digestors. Appl. Microbiol. Biotechnol. [Internet]. 1995, [consultado el 21 de octubre de 2019], 43(3):559-565. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00218466>
80. Hill DT, Cobb SA, Bolte, JP. Using Volatile Fatty Acid Relationships to Predict Anaerobic Digester Failure. ASABE [Internet]. 1987 [consultado el 21 de octubre de 2019], 30(2):496-501. Disponible en: <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=31977>
81. Montes Carmona ME. Estudio técnico-económico de la digestión anaerobia conjunta de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos y lodos de depuradora para la obtención de biogás [Internet] [Tesis Doctoral] [Madrid, España]: Universidad Politécnica de Madrid; 2008. [Consultado el 22 de octubre de 2019] Disponible en: <http://oa.upm.es/1049/>
82. Fukuzaki S, Nishio N, Shobayashi M, Nagai S. Inhibition of fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. Appl. Environ. Microbiol. [Internet]; 1990 Mar [consultado el 22 de octubre de 2019], 56(3):719-723 Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183412/>
83. Barredo MS, Evison LM. Effect of propionate toxicity on methanogen-enriched sludge, *Methanobrevibacter smithii*, and *Methanospirillum hungatii* at different pH values. Appl. Environ. Microbiol.; 1991 Jun 1, 57(6):1764-1769
84. Ahring BK, Westermann P. Product Inhibition of butyrate metabolism by acetate and hydrogen in a thermophilic coculture. Appl. Environ. Microbiol.; 1988 Oct 1, 54(10):2393-2397.
85. Aymerich E, Esteban-Gutiérrez M, Sancho L. Analysis of the stability of high-solids anaerobic digestion of agro-industrial waste and sewage sludge. Bioresour Technol; 2013 Sep, 144:107-114.
86. Clavijo Salinas JC. Evaluación del proceso de digestión anaeróbica de vianza pretratada con procesos avanzados de oxidación como alternativa energética de implementación tecnológica en un proceso de producción de etanol a partir de caña de azúcar [Internet] [Trabajo Fin de Máster]. [Palmira, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia; 2015. [Consultado el 22 de octubre de 2019] Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/48678/>
87. Fernández Villagómez G, Vázquez Borges E, Martínez Pereda P. Inhibidores del proceso anaerobio: compuestos utilizados en porcicultura. Ingeniería. [Internet] 2002. [consultado el 23 de octubre de 2019], 6(3):67-71. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/467/46760307.pdf>
88. De Souza ME. Factores que influenciam a digestão anaeróbia. DAE [Internet]; 1984 Jun, [Consultado el 23 de octubre de 2019], 44(137):88-94. Disponible en: https://www.cetesb.sp.gov.br/biogas/wp-content/uploads/sites/3/2014/11/revista_dae_vol44_n137_1984.pdf

89. Lettinga G, Hulshoff-Pol LW, Zeeman G. Lecture notes: Biological wastewater treatment. Part I: Anaerobic Wastewater Treatment. Wageningen, Países Bajos: Wageningen University & Research; 1999 Dic.
90. Gosh S, Conrad JR, Klass DL. Anaerobic acidogenesis of wastewater sludge. *Journal WPCF*; 1975 En., 47(1):30-45.
91. Hickey RF, Vanderwielen J, Switzenbaum MS. The effect of heavy metals on methane production and hydrogen and carbon monoxide levels during batch anaerobic sludge digestion. *Water Research*; 1989 Feb 1, 23(2):207-218.
92. Pereira MA, Pires OC, Mota M, Alves MM. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnol. Bioeng.* [Internet]; 2005 Oct 5, [Consultado 25 de octubre de 2019], 92(1):15-23. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/bit.20548>
93. Neves L, Gonçalves E, Oliveira R, Alves MM. Influence of composition on the biomethanation potential of restaurant waste at mesophilic temperatures. *Waste Management*; 2008 En.1, 28(6):965-972
94. Appels L, Baeyens J, Degreè J, Dewil R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Progress in Energy and Combustion Science*; 2008, 34(6):755-781.
95. Pereira MA, Sousa DZ, Mota M, Alves MM. Lipids and LCFA inhibition: key parameter in anaerobic digestion process. En: Bonmatí Blasi A, Palatsi Civit J, Prenafeta-Boldú FX, Fernández B, Flotats Ripoll X. II Congreso Español de Gestión Integral de Deyecciones Ganaderas; 2010 Jun 8-10; Barcelona. y International workshop on anaerobic digestion of slaughterhouse waste; 2010 Jun 11; Barcelona. ECOFARM; 2010. p.357-362
96. Boone DR, Xun L. Effects of pH, temperature and nutrients on propionate degradation by methanogenic enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* [Internet]; 1987 Jul 1 [consultado el 25 de octubre de 2019], 53(3):1589-1592. Disponible en: <https://aem.asm.org/content/aem/53/7/1589.full.pdf>
97. Harper SR, Pohland FG. Recent developments in hydrogen management during anaerobic biological wastewater treatment. *Biotechnol. Bioeng.*; 1986, 28(4):585-602
98. Hill DT, Cobb SA. Modelling predictive indicators in animal waste methanogenesis, ASABE [Internet]; 1993, [consultado el 27 de octubre de 2019], 36(3):879-885. Disponible en: <https://elibrary.asabe.org/abstract.asp?aid=28412>
99. Rodríguez Suárez S. Tecnologías de biodigestión aplicadas al turismo [Internet] [Trabajo Fin de Grado]. [San Cristóbal de La Laguna, Tenerife]: Universidad de La Laguna; 2015. [Consultado el 27 de octubre de 2019] Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/1390/Tecnologias%20de%20biodigestion%20aplicadas%20al%20turismo.pdf?sequence=1>
100. Omil F, Méndez R, Lema JM. Anaerobic treatment of saline wastewaters under high sulphide and ammonia content. *Bioresource Technology*; 1995 En. 1, 54(3):269-278.
101. García-García I, Bonilla Venceslada JL, Peña Jiménez PR, Ramos Gómez E. Biodegradation of phenol compounds in vinasse using *Aspergillus terreus* and *Geotrichum candidum*. *Water Research*; 1997, 31(8):2005–2011
102. Martín MA, Raposo F, Borja R, Martín A. Kinetic study of the anaerobic digestion of vinasse pretreated with ozone, ozone plus ultraviolet light, and ozone plus ultraviolet light in the presence of titanium dioxide. *Process Biochemistry*; 2002, 37(7):699–706
103. Parnaudeau V, Condom N, Oliver R, Cazevielle P, Recous S. Vinasse organic matter quality and mineralization potential, as influenced by raw material, fermentation and concentration processes. *Bioresource Technology* [Internet]; 2008 Abr 1, [consultado el 27 de octubre de 2019], 99(6):1553–62. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.012>

104. Santana VS, Fernandes Machado NRC. Photocatalytic degradation of the vinasse under solar radiation. *Catalysis Today* [Internet]; 2008, [consultado el 28 de octubre de 2019], 133-135:606–610. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2007.12.131>
105. Siles JA, García-García I, Martín A, Martín MA. Integrated ozonation and biomethanization treatments of vinasse derived from ethanol manufacturing. *Journal of Hazardous Materials*; 2011 Abr 15, 188(1-3):247–253.
106. Massé DI, Lu D, Masse L, Droste RL. Effect of antibiotics on psychrophilic anaerobic digestion of swine manure slurry in sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*; 2000 Dic 1, 75(3):205–211
107. Hilpert R, Winter J, Kandler O. Agricultural feed additives and disinfectants as inhibitory factors in anaerobic digestion. *Agricultural Wastes* [Internet]; 1984, [consultado el 1 de noviembre de 2019], 10(2):103–116. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0141-4607\(84\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0141-4607(84)90010-6)
108. García MT, Campos E, Dalmau M, Illan P, Sanchez-Leal J. Inhibition of biogas production by alkyl benzene sulfonates (LAS) in a screening test for anaerobic biodegradability. *Biodegradation*; 2006 Feb 1, 17(1):39–46.
109. Van Lier JB, Hulsbeek J, Stams AJ, Lettinga G. Temperature susceptibility of thermophilic methanogenic sludge: implication for reactor start-up and operation. *Bioresource technology*; 1993 En 1, 43(3):227–235.
110. Gerardi MH. *The microbiology of anaerobic digesters*. Hoboken, Nueva Jersey, EE.UU.: John Wiley & Sons; 2003 Sep 19. 192 p.
111. Parra Huertas RA. Digestión anaeróbica: mecanismos biotecnológicos en el tratamiento de aguas residuales y su aplicación en la industria alimentaria. *Producción + Limpia*; 2015, 10(2):142–159.
112. Álvarez-Arregui A, Herrera-Prats L, Colomer FJ, Gallardo A, Carlos-Alberola M, Gomez-Parra AM. Codigestión de biorresiduos para su biometanización. XVI Congreso Internacional de Ingeniería de Proyectos; 2012 Jul 11–13; Valencia. Valencia: Universidad Jaume I
113. Rojas Sossa JP. Evaluación de la producción de biogás por medio de la biodigestión anaerobia semicontinua utilizando residuos del beneficiado del café como sustrato [Internet] [Trabajo Fin de Grado] [Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica]: Universidad de Costa Rica; 2015 [consultado el 1 de noviembre de 2019] Disponible en: repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3094/1/39273.pdf
114. Ahring BK, Angelidaki I, Conway De Macario C, Gavala HN, Hofman-Bang J, Oude SJWH et al. *Biomethanation I*. Springer Science & Business Media; 2003 Abr 7. 220 p.
115. Murillo Roos M. Production of biogas from organic waste in microreactors operated at two temperatures [Tesis Doctoral] [Costa Rica]: Universidad de Costa Rica; 2014
116. Rizvi H, Ahmad N, Abbas F, Bukhari IH, Yasar A, Ali S et al. Start-up of UASB reactors treating municipal wastewater and effect of temperature/sludge age and hydraulic retention time (HRT) on its performance. *Arabian Journal of Chemistry*; 2015 Nov 1, 8(6):780–786.
117. Penaud V, Delgenes JP, Torrijos M, Moletta R, Vanhoutte B, Cans P. Definition of optimal conditions for the hydrolysis and acidogenesis of a pharmaceutical microbial biomass. *Process Biochemistry*; 1997, 32(6):515–521.
118. Maharaj I, Elefsiniotis P. The role of HRT and low temperature on the acid-phase anaerobic digestion of municipal and industrial wastewaters. *Bioresource Technology*; 2001 Feb 1, 76(3):191–197.
119. Hernández Muñoz A. Depuración y desinfección de aguas residuales. Servicio de Publicaciones del Colegio de Ingenieros de Caminos, Canales y Puertos; 2005. 1186 p.
120. Ghosh S. Improved sludge gasification by two-phase anaerobic digestion. *Journal of Environmental Engineering*; 1987 Dic, 113(6):1265–1284
121. Henry MP, Sajjad A, Ghosh S. The effects of environmental factors on acid-phase digestion of sewage sludge. En: 42ª Purdue Industrial Waste Conference Proceedings; 1987 May 12; West

- Lafayette, Indiana, EE.UU.. Chelsea, Michigan, EE.UU.: Institute of Gas Technology; 1987 En 1 p.727-737.
122. Van Lier JB. Thermophilic anaerobic wastewater treatment: temperature aspects and process stability [Internet] [Tesis Doctoral] [Wageningen, Países Bajos]: Wageningen University; 1995 [consultado el 1 de noviembre de 2019] Disponible en: <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/30066>
 123. Mao C, Feng Y, Wang X, Ren G. ChemInform Abstract: Review on Research Achievements of Biogas from Anaerobic Digestion. ChemInform. 2016 Jun; 47:28.
 124. Hobson PN. The treatment of agricultural wastes, en anaerobic digestion: a waste treatment technology. Critical reports on applied chemistry; 1995, 31:121.
 125. Hwu CS, Lettinga G. Acute toxicity of oleate to acetate-utilizing methanogens in mesophilic and thermophilic anaerobic sludges. Enzyme and Microbial Technology; 1997 Sep, 21(4):297-301.
 126. Krugel S, Nemeth L, Peddie C. Extending thermophilic anaerobic digestion for producing class a biosolids at the greater vancouver regional districts annacis island wastewater treatment plant. Water Science and Technology; 1998 En. 1, 38(8-9):409-416.
 127. Ho MW. The rainbow and the worm: The Physics of Organisms. Nueva Jersey: World Scientific Publishing Company; 2008 Agto 6.
 128. Ward A, Hobbs P, Holliman P, Jones D. Optimisation of the anaerobic digestion of agricultural resources. Bioresource Technology; 2008, 99(17):7928-7940.
 129. Noone GP. The treatment of domestic wastes. En: Wheatley A, editores. Anaerobic digestion: a waste treatment technology. Chapman & Hall; 1990. p.139-170.
 130. Trisakti B, Matseh I, Zahara I, Turmuzi M. Effect of agitation on methanogenesis stage of two-stage anaerobic digestion of palm oil mill effluent (POME) into biogas. En: Taufany F, Widiyastuti W, Nurkhamidah S. Proceedings of the 3rd International Seminar on Fundamental and Application of Chemical Engineering 2016. 3rd International Seminar on Fundamental and Application of Chemical Engineering 2016 (ISFACHE 2016); 2016. Indonesia: AIP Publishing; 2017 May 24, 1840(1):050004. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317144232_Effect_of_agitation_on_methanogenesis_stage_of_two-stage_anaerobic_digestion_of_palm_oil_mill_effluent_POME_into_biogas
 131. Muñoz Valero JA, Ortiz Cañavate J, Vázquez Minguela J. Técnica y aplicaciones agrícolas de la biometanización. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, España: Secretaría General Técnica; 1987.
 132. Fannin KF. Start-up, operation, stability, and control. En: Chynoweth DY, Isaacson R, editores. Anaerobic digestion of biomass. Nueva York, EEUU: Elsevier Applied Science; 1987, p.171-196
 133. McMahon K, Stroot PG, Mackie RI, Raskin L. Anaerobic codigestion of municipal solid waste and biosolids under various mixing conditions–II: microbial population dynamics. Water Research; 2001May 1, 35(7):1817-1827.
 134. Vavilin VA, Angelidaki I. Anaerobic degradation of solid material: Importance of initiation centers for methanogenesis, mixing intensity, and 2D distributed model. Biotechnology and Bioengineering; 2005 En. 5, 89(1):113-122.
 135. Guevara CA, Arenas HA, Mejía A, Peláez CA. Obtención de Etanol y Biogás a partir de banano de rechazo. Información tecnológica; 2012, 23(2):19-30.
 136. Speece RE, Boonyakitsombut M, Kim M, Azbar N, Ursillo P. Overview of Anaerobic Treatment: Thermophilic and Propionate Implications. Water Environment Research [Internet]; 2006, [consultado el 2 de noviembre de 2019], 78:460-473 Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Moonil_Kim/publication/7029627_Overview_of_anaerobic_treatment_thermophilic_and_propionate_implications/links/004635328003bbc0ec000000.pdf
 137. Andreas Dareioti M, Kornaros M. Anaerobic mesophilic co-digestion of ensiled sorghum, cheese whey and liquid cow manure in a twostage CSTR system: Effect of hydraulic retention time. Bioresource Technology; 2015 En 1, 175:553–562.

138. Hassan AN, Nelson BK. Invited review: Anaerobic fermentation of dairy food wastewater. *Journal of Dairy Science*; 2012 Nov 1, 95(11):6188-6203
139. De la Torre Caritas N. Digestión anaerobia en comunidades rurales [Internet] [Trabajo Fin de Grado]. [Madrid, España]: Universidad Carlos III; 2008. [consultado el 2 de noviembre de 2019] Disponible en: <https://e-archivo.uc3m.es/handle/10016/11627>
140. Muzenda E. Bio-methane Generation from Organic Waste: A Review. En: Ao SI, Douglas C, Grundfest WS, Burgstone J. *Proceedings of the World Congress on Engineering and Computer Science 2014 Vol II, World Congress on Engineering and Computer Science 2014 (WCECS 2014)*; 2014 Oct 22-24; San Francisco, EE.UU. Newswood Limited.
141. Chynoweth DP, Owens JM, Legrand R. Renewable methane from anaerobic digestion of biomass. *Renewable Energy*. 2001 En 1; 22(1-3):1-8.
142. Díaz de Basurto Burgos A. Diseño, construcción y puesta en marcha de un biodigestor anaerobio con residuos orgánicos generados en el mercado de Tiquipaya (Bolivia) [Internet] [Trabajo Fin de Master] [Barcelona, España]: Escuela Técnica Superior de ingeniería de caminos, canales y puertos; 2013, p. 89 [Consultado el 2 de noviembre de 2019] Disponible en: <https://upcommons.upc.edu/handle/2099.1/20647>
143. Rincón B, Sánchez E, Raposo F, Borja R, Travieso L, Martín MA, et al. Effect of the organic loading rate on the performance of anaerobic acidogenic fermentation of two-phase olive mill solid residue. *Waste Manag*; 2008 En 1, 28(5):870-7.
144. Oktem YA, Ince O, Donnelly T, Sallis P, Ince BK. Determination of optimum operating conditions of an acidification reactor treating a chemical synthesis based pharmaceutical wastewater. *Process Biochemical*; 2006 Nov 1, 41(11):2258–2263.
145. Lim SJ, Kim BJ, Jeong CM, Choi J, Ahn YH, Chang HN. Anaerobic organic acid production of food waste in once-a-day feeding and drawing-off bioreactor. *Bioresource Technology*; 2008 Nov 1, 99(16):7866–7874.
146. Washington State University. *Compost Fundamentals* [Internet] Whatcom County Extension. [consultado el 2 de noviembre de 2019] Disponible en: http://whatcom.wsu.edu/ag/compost/fundamentals/biology_aerobic.htm
147. Khalid A, Arshad M, Anjum M, Mahmood T, Dawson L. The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste Management*; 2011 Ago 1, 31(8):1737-1744
148. Speece RE. Toxicity. En: Chynoweth DY, Isaacson R, editores. *Anaerobic digestion of biomass*. Nueva York, EEUU: Elsevier Applied Science; 1987, p.129-140
149. Flotats X, Campos E, Bonmatí A. *Aprovechamiento energético de residuos ganaderos*. Lleida, España: Universidad de Lleida; 1997 Oct: 1-20
150. Frear C, Liao W, Ewing T, Chen S. Retraction: Evaluation of Co-Digestion at a Commercial Dairy Anaerobic Digester. *CLEAN–Soil, Air, Water*; 2011, 39(7):697-704.
151. Mata-Alvarez J, Macé S, Llabrés P. Anaerobic digestion of organic solid wastes. An overview of research achievements and perspectives. *Bioresource Technology*; 2000 Ago 1, 74(1):3-16.
152. Dai X, Duan N, Dong B, Dai L. High-solids anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste in comparison with mono digestions: Stability and performance. *Waste Management*; 2013, 33(2):308-316.
153. Angelidaki I, Ahring BK. Codigestion of olive oil mill wastewaters with manure, household waste or sewage sludge. *Biodegradation*; 1997 Jul 1, 8(4):221-226.
154. Mata-Alvarez J, Dosta J. LA CODIGESTIÓN: Revisión de una realidad muy ventajosa en los aspectos medioambientales y económicos de la digestión anaerobia. 1ª Jornada técnica depuración aguas residuales: Digestión Anaerobia; 2016 Jul 7 y 8; Universitat Jaume I. Castellón de la Plana, Comunidad Valenciana, España: Cátedra FACSA-UJI.

155. Ağdağ ON, Sponza DT. Co-digestion of mixed industrial sludge with municipal solid wastes in anaerobic simulated landfilling bioreactors. *Journal of Hazardous Materials*; 2007 Feb 9, 140(1-2):75-85.
156. Alvarez R, Lidén G. Semi-continuous co-digestion of solid slaughterhouse waste, manure, and fruit and vegetable waste. *Renewable Energy*; 2008 Abr 1, 33(4):726-734.
157. Robra S, Serpa da Cruz R, de Oliveira AM, Almeida Neto JA, Santos JV. Generation of biogas using crude glycerin from biodiesel production as a supplement to cattle slurry. *Biomass and Bioenergy*; 2010 Sep, 34(9):1330-1335.
158. Umetsu K, Yamazaki S, Kishimoto T, Takahashi J, Shibata Y, Zhang C et al. Anaerobic co-digestion of dairy manure and sugar beets. *International Congress Series*; 2006 Jul 1, 1293:307-310.
159. González ET, Jurado PC. Sustratos y producción de biogás en biodigestores. Una revisión sistemática. *Ingeciencia*; 2017 Agto, 2(1):44-64.
160. Cestonaro T, de Mendonça Costa MSS, de Mendonça Costa LA, Teofilo Rozatti MA, Ceri Pereira D et al. The anaerobic co-digestion of sheep bedding and $\geq 50\%$ cattle manure increases biogas production and improves biofertilizer quality. *Waste Management*; 2015 Dic, 46:612-618.
161. Agyeman FO, Tao W. Anaerobic co-digestion of food waste and dairy manure: Effects of food waste particle size and organic loading rate. *Journal of Environmental Management* [Internet]; 2014 En. 15 [consultado el 2 de noviembre de 2019], 133:268-274. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.016>
162. Fang C, Boe K, Angelidaki I. Anaerobic co-digestion of by-products from sugar production with cow manure. *Water Research*; 2011 May 1, 45(11):3473-3480.
163. Xavier CAN, Moset V, Wahid R, Møller HB. The efficiency of shredded and briquetted wheat straw in anaerobic co-digestion with dairy cattle manure. *Biosystems Engineering*; 2015 Nov, 139:16-24.
164. Buendía IM, Fernández FJ, Villaseñor J, Rodríguez L. Feasibility of anaerobic co-digestion as a treatment option of meat industry wastes. *Bioresource Technology*; 2009 Mar., 100(6):1903-1909.
165. Nzila A. Mini review: Update on bioaugmentation in anaerobic processes for biogas production. *Anaerobe*; 2017 Agto 1, 46:3-12.
166. Rossi Caballeros LM. Potencialidad de residuos mineros aplicados a los efluentes de la industria azucarera (vinazas) en la producción de biogás [Internet] [Trabajo Fin de Grado] (2010). [Guatemala, Guatemala]: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2010 May. p. 107 [Consultado el 2 de noviembre de 2019] Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1157_Q.pdf
167. Preeti Rao P, Seenayya G. Improvement of methanogenesis from cow dung and poultry litter waste digesters by addition of iron. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*; 1994 Mar 1, 10(2):211-214.
168. Demirel B, Scherer P. Trace element requirements of agricultural biogas digesters during biological conversion of renewable biomass to methane. *Biomass and Bioenergy*; 2011, 35(3):992-998.
169. Pereda Reyes I, Irusta Mata R, Oliva Terencio D. Uso de los residuos sólidos mineros de la extracción del níquel como estimulantes para la producción de biogás. *Ingeniería Mecánica*; 2007, 10(1):57-61.
170. Chakraborty N, Chatterjee M, Sarkar GM, Lahiri SC. Inhibitory effects of the divalent metal ions on biomethanation by isolated mesophilic methalogen in AC21 medium in presence of absence of juices from water hyacinth. *Bioenerg. Res.*; 2010 Dic 1, 3(4):314-320.
171. Jin H, Li B, Jin H, Zhu G. Enhanced methane production in an anaerobic continuous stirred tank reactor by adding nitroacetic acid to increase the activity of methanogenic bacteria. *Energy Procedia*; 2011, 11:3591-3598.
172. Mancillas-Salas S, Rodríguez-de la Garza JA, Ríos-González L. Bioestimulación de la digestión anaerobia. *AQM*; 2012, 4(8):56-62.

173. Zhong W, Zhang Z, Luo Y, Sun S, Qiao W, Xiao M. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production. *Bioresour. Technol.*; 2011 Dic.1, 102(24):11177–11182.
174. Zhang Q, He J, Tian M, Mao Z, Tang L, Zhang J et al. Enhancement of methane production from cassava residues by biological pretreatment using a constructed microbial consortium. *Bioresour. Technol.*; 2011 Oct 1, 102(19):8899–8906.
175. Cavaleiro AJ, Sousa DZ, Alves MM. Methane production from oleate: assessing the bioaugmentation potential of *Syntrophomonas zehnderi*. *Water Res.*; 2010, 44(17):4940–4947.
176. Zhang J, Guo RB, Qiu YL, Qiao JT, Yuan XZ, Shi XS et al. Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresour. Technol.*; 2015 Mar 1, 179:306–313.
177. Ács N, Bagi Z, Rákhely G, Minárovics J, Nagy K, Kovács KL. Bioaugmentation of biogas production by a hydrogen-producing bacterium. *Bioresour. Technol.*; 2015 Jun 1, 186:286–293.
178. Tale VP, Maki JS, Zitomer DH. Bioaugmentation of overloaded anaerobic digesters restores function and archaeal community. *Water Res.*; 2015 Mar 1, 70:138–147.
179. Akila G, Chandra TS. Stimulation of biomethanation by *Clostridium* sp. PXYL1 in coculture with a *Methanosarcina* strain PMET1 at psychrophilic temperatures. *J. Appl. Microbiol.*; 2010 En, 108(1):204–213.
180. Ganzoury MA, Allam NK. Impact of nanotechnology on biogas production: a mini-review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*; 2015 Oct 1; 50:1392–1404.
181. Sedlak M, Ho NWY. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose. *App. Biochem. Biotechnol.*; 2004 Mar, 114(1-3):403–416.